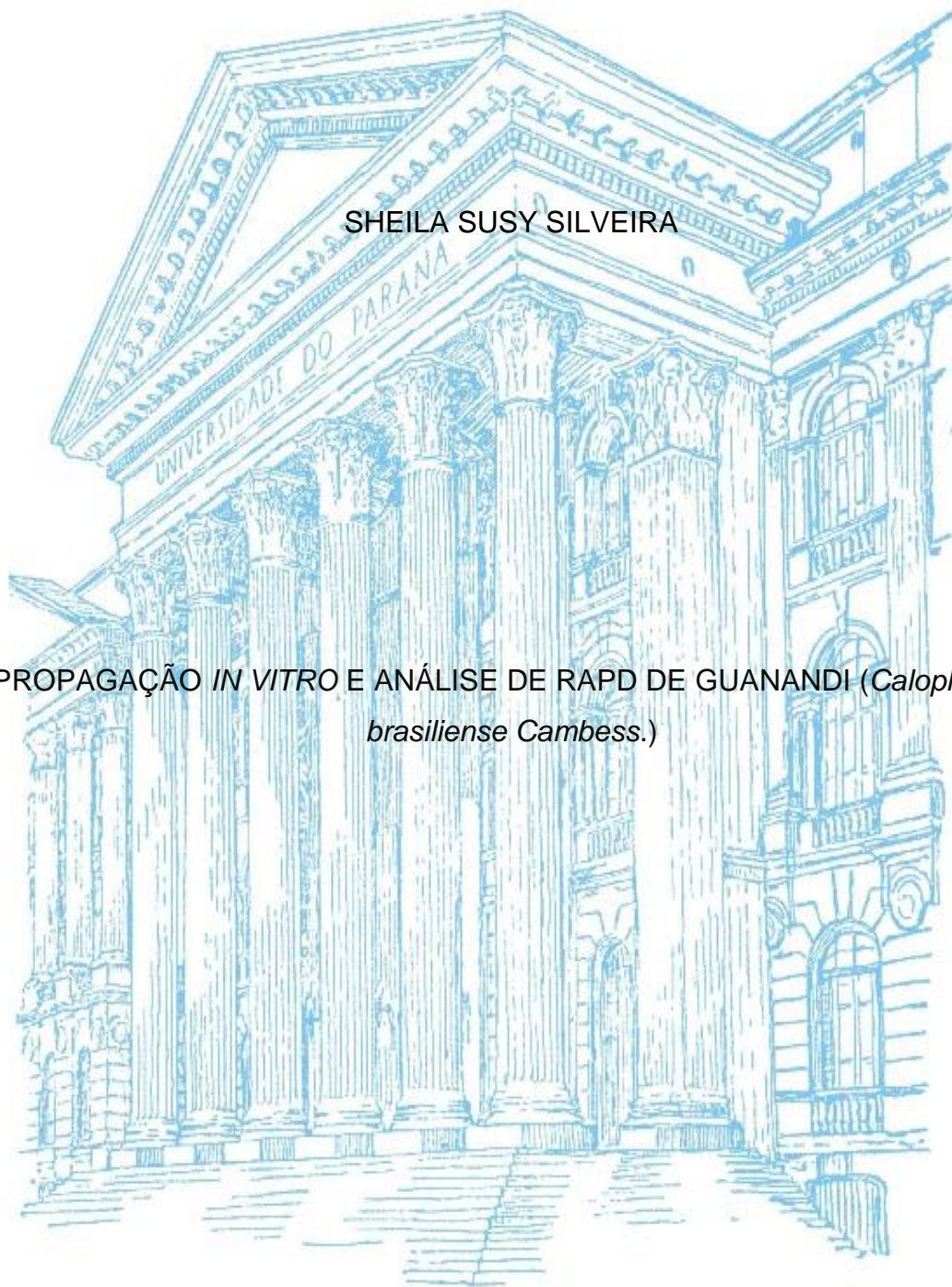


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SHEILA SUSY SILVEIRA

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ANÁLISE DE RAPD DE GUANANDI (*Calophyllum  
brasiliense* Cambess.)



CURITIBA

2014

SHEILA SUSY SILVEIRA

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ANÁLISE DE RAPD DE GUANANDI (*Calophyllum  
brasiliense* Cambess.)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica, no Curso de Pós-Graduação em Botânica, Área de Concentração em Estrutura e Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marguerite Quoirin  
Co-orientadora: Juliana Degenhardt-Goldbach  
Co-orientador: Guilherme Schnell e Schühli

CURITIBA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**“GERMINAÇÃO, PROPAGAÇÃO IN VITRO E ANÁLISES  
DE RAPD DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense*  
*Cambess.*)”**  
por

**SHEILA SUSY SILVEIRA**

Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre no Programa  
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão  
formada pelos Professores

**Profª Drª Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin (UFPR)**  
- PRESIDENTE

**Profª Drª Rosete Pescador (UFSC)**

**Profª Drª Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)**

**Curitiba, 06 de março de 2014.**

À minha mãe, Erotides.

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Erotides e Anael, por me apoiarem quando decidi fazer o Mestrado. À minha irmã, Debora, especialmente por revisar os textos em inglês.

À professora Marguerite Quoirin, por me aceitar como orientada, ainda que não tivesse experiência nenhuma com micropropagação.

À Juliana Degenhardt-Goldbach, da Embrapa-Florestas, por muitas ideias para o projeto e fornecimento das mudas.

Agradeço a Guilherme Schühli, também da Embrapa, pelo auxílio inestimável com os estudos moleculares. Estou certa que sem você eu não conseguiria ter aprendido tanto em tão pouco tempo.

À CAPES pelo apoio financeiro. À Embrapa-Florestas por permitir o uso do Laboratório de Genética.

Agradeço imensamente ao meu namorado, João, pelo apoio incondicional, auxílio nas revisões e discussões e por ter evitado que eu me subalimentasse.

Agradeço a Rodrigo Cordeiro por me ensinar boa parte do que sei sobre micropropagação. Agradeço pelas conversas, pelas “artes” e pelos jogos durante a madrugada.

À Denisele Neuza Aline Flores Borges (estou certa que reclamaria se eu não colocasse seu nome completo), pela ajuda durante o Mestrado, companhia nas idas ao RU e o apoio moral.

Aos colegas do Laboratório de Micropropagação, que de uma maneira ou de outra me auxiliaram durante esses dois anos: Bruno Reis, Keila Alves do Prado, João Delfrate, Juliane Nesi, Lucas Gomes, Rudolfo Jacobs, Silvia Almeida, Silvia Martin, Sirlene Vudala e Tamires Burda.

À Marianne Bernardes e Daiane Rigoni, do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa-Florestas, pela ajuda constante. Aos demais colegas do mesmo laboratório: Cassiana de Oliveira, Daniele Kael, Eliza Busch e Renata Grunennvaldt.

A todos vocês, meu muito obrigada!

*A maioria dos homens tem, como as plantas, propriedades ocultas, que o acaso põe a descoberto.*

François de La Rochefoucauld

## RESUMO

O guanandi é uma espécie com grande potencial para utilização na indústria madeireira, reposição de mata ciliar e extração de compostos medicinais, mas sua reprodução na natureza é limitada porque a frutificação é irregular e as sementes são recalcitrantes. A germinação *in vitro* foi estudada, assim como a micropropagação, usando segmentos nodais de plantas de casa de vegetação. Para a germinação *in vitro*, a maior taxa de obtenção de sementes não contaminadas (93,3%) foi obtida mantendo-as por 48h em solução a 0,2% de PPM™, sendo então introduzidas em meio WPM contendo a mesma concentração do biocida. Para acelerar a germinação, as sementes permaneceram em água ou solução de GA<sub>3</sub> (2,89 a 28,89 µM) por 24 ou 48 h. A taxa de germinação foi reduzida conforme a permanência em solução, de 70,6% (24h) para 60% (48h), enquanto o IVG foi incrementado com o uso de 5,57 e 14,47 µM de GA<sub>3</sub>. Para a micropropagação a partir de segmentos nodais obtidos de plantas de casa de vegetação, a adição de 0,4 ou 0,8% de PPM™ ao meio de cultura resultou na sobrevivência de 92% dos explantes introduzidos *in vitro*. Antioxidantes foram incorporados separadamente ao meio de cultura, sendo 1 g.L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP-40), 1 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 200 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, ácido cítrico ou ácido ascórbico. O PVP-40 reduziu a oxidação de 85% (controle) para 15%. Para multiplicação, 4,4 a 11 µM de BAP foram adicionados ao meio de cultura. Não houve diferença entre o número de brotações na presença de qualquer concentração de BAP (4,4 a 4,8 por explante) e o uso de 11 µM resultou em alta taxa de necrose. Para o alongamento, foram testados BAP (1,1 ou 2,2µM) e GA<sub>3</sub> (até 11,15 µM), mas, após 60 dias, não houve alongamento e o GA<sub>3</sub> provocou a necrose dos explantes. Durante o enraizamento, os explantes permaneceram por 7 dias no escuro em meio contendo AIB ou ANA, a 10 ou 20 µM, sendo transferidos para meio sem reguladores. Após 60 dias, 24% dos explantes tratados com 10 µM de ANA enraizaram, mas apenas 8% dos tratados com AIB. As plantas enraizadas foram transferidas para casa de vegetação e, após 30 dias, a sobrevivência foi de 78,9%. Análises RAPD foram realizadas com o propósito de identificar linhagens de plantas mais responsivas às auxinas usadas durante o enraizamento. Para tal, foram utilizadas folhas de plantas de casa de vegetação e micropropagadas, após fase de enraizamento. Foram utilizados 4 primers e foram encontrados 26 loci, dos quais 21 polimórficos (87,5%), com número de alelos efetivos por loci de 1,87 e 1,39. A diversidade genética de Nei foi de 0,24. A substituição do nitrogênio por armazenamento a -80°C, juntamente com a adição de PVP, foi eficiente para evitar a oxidação das amostras de plantas *in vitro*. O agrupamento de plantas, tanto pelo método UPGMA quanto pelo Neighbor-joining pode indicar um grupo de matrizes particularmente responsivo à auxina. A inclusão de maior número de primers e análises mais específicas podem ser realizadas futuramente para refinar os resultados obtidos no presente trabalho.

Palavras-chave: Antioxidantes, meio WPM, RAPD, sementes.

## ABSTRACT

Guanandi is a species with great potential for use in the timber industry, replacement of riparian vegetation and treatment of diseases, but their reproduction in nature is limited because its fruiting is erratic and seeds are recalcitrant. *In vitro* germination was tested as well as micropropagation, using nodal segments of greenhouse plants. During *in vitro* germination, a high rate of not contaminated seeds (93.3%) was obtained keeping them in a 0.2% PPM™ solution for 48h. In order to accelerate germination, seeds were kept in water or GA<sub>3</sub> solution (2.89 to 28.89 µM) for 24 or 48 h. Germination was reduced from 70.6% (24h) to 60% (after 48h imbibition in GA<sub>3</sub> solutions). The GSI was increased with the use of 5.57 and 14.47 µM GA<sub>3</sub>. For micropropagation from nodal segments obtained from greenhouse plants, the addition of 0.4 or 0.8% of PPM™ to culture medium resulted in survival rate of 92% of explants. Antioxidants were also added separately to the culture medium: 1 g.L<sup>-1</sup> polyvinylpyrrolidone (PVP-40), 1 g.L<sup>-1</sup> of activated charcoal, 200 mg.L<sup>-1</sup> of cysteine, ascorbic acid or citric acid. PVP-40 reduced the oxidation of 85% (control) to 15%. For bud multiplication, 4.4 to 11 µM BAP were used. There was no difference between the number of shoots per explant with BAP (4,4 up to 4,8 per explant) and the use of 11 µM resulted in a high rate of necrosis. For elongation, BAP (1.1 or 2.2 µM) and GA<sub>3</sub> (up to 11.15 µM) were tested, but after 60 days, no elongation was observed and GA<sub>3</sub> resulted in necrosis. For rooting, explants remained on a medium containing IBA or NAA (10 or 20 µM), for 7 days in the dark being transferred to a medium without regulators. After 60 days, 24% of the explants treated with 10 µM NAA rooted, but only 8% of those treated with IBA. The rooted plants were transferred to the greenhouse and, after 30 days, the survival rate was 78.9%. RAPD analysis was carried on, in order to identify genotypes responsive to the auxins used for rooting. Leaves of greenhouse and micropropagated plants (after rooting phase) were used. Four primers were used and 26 loci were observed, of which 21 (87.5%) were polymorphic, with an average number of alleles of 1.87 and effective number of alleles of 1.39 per loci. The Nei genetic diversity was 0.24. The substitution of liquid nitrogen by storage at -80°C along with the addition of PVP was effective to prevent oxidation of the samples of *in vitro* plants. Grouping of plants by UPGMA or Neighbor-joining method may indicate a group of plants particularly responsive to auxin present in the culture medium. The inclusion of a greater number of primers and more specific analyzes can be performed in the future to refine the results obtained in the present work.

Keywords: Antioxidants, RAPD, seed, WPM.



## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	- ácido ascórbico
AC	- ácido cítrico
AFLP	- <i>Amplified fragment length polymorphism</i>
AIB	- ácido indolbutírico
ANA	- ácido naftalenoacético
BAP	- 6-benzilaminopurina
CA	- carvão ativado
Cis	- cisteína
GA <sub>3</sub>	- ácido giberélico
HgCl <sub>2</sub>	- cloreto de mercúrio
NaOCl	- hipoclorito de sódio
NJ	- <i>Neighbor-joining</i>
PPM™	- <i>Plant Preservative Mixture</i> (Mistura preservativa de plantas)
PVP-40	- polivinilpirrolidona
RAPD	- <i>Random amplified polymorphic DNA</i>
RFLP	- <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
TDZ	- tidiazuron
UPGMA	- <i>Unweighted pair group method using arithmetic averages</i>
WPM	- <i>Woody plant medium</i>

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>16</b>
<b>RESUMO</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>19</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>20</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>21</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
<b>2.1 O GUANANDI</b>	<b>17</b>
<b>2.2 MICROPROPAGAÇÃO</b>	<b>20</b>
2.2.1 Conceitos gerais	20
2.2.2 Desinfestação do material vegetal	21
2.2.3 Germinação <i>in vitro</i> de sementes	22
2.2.4 Multiplicação de brotações	23
2.2.5 Enraizamento	24
2.2.6 Aclimatização	25
<b>2.3 ANÁLISE MOLECULAR</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>32</b>
<b>GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GUANANDI (<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.)</b>	<b>32</b>
<b>RESUMO</b>	<b>32</b>
<b>CHAPTER 1</b>	<b>33</b>
<b><i>IN VITRO</i> GERMINATION OF GUANANDI (<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.)</b>	<b>33</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>33</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>34</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>2.1 MATERIAL VEGETAL</b>	<b>35</b>
<b>2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS</b>	<b>35</b>
2.2.1 Desinfestação com hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio	35
2.2.2 Adição de Cercobin® ao meio de cultura	36
2.2.3 Tratamento das sementes com PPM™ e imersão em água	36
<b>2.3 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i></b>	<b>37</b>

2.3.1 Giberelina na germinação <i>in vitro</i> de sementes de guanandi.....	37
<b>2.4 MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES .....</b>	<b>38</b>
<b>2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>39</b>
<b>2.6 CONDIÇÕES DE CULTURA .....</b>	<b>39</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES E GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Permanência em água e desinfestação com hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio .....	40
3.1.2 Adição de Cercobin® ao meio de cultura.....	43
3.1.3 Efeito do tratamento das sementes com PPM™ e imersão em água na contaminação e germinação. ....	45
<b>3.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Giberelina na germinação <i>in vitro</i> de sementes de guanandi.....	48
<b>3.4 MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>57</b>
<b>MICROPROPAGAÇÃO DE GUANANDI (<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.) A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS .....</b>	<b>57</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>57</b>
<b>CHAPTER 2 .....</b>	<b>58</b>
<b>MICROPROPAGATION OF GUANANDI (<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess.) FROM NODAL SEGMENTS.....</b>	<b>58</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>58</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>62</b>
<b>2.1 MATERIAL VEGETAL .....</b>	<b>62</b>
<b>2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS .....</b>	<b>62</b>
2.2.1 Desinfestação utilizando cloreto de mercúrio .....	62
2.2.2 Adição de PPM™ no meio de cultura.....	63
2.2.3 Adição de antioxidantes e adsorventes ao meio de cultura WPM.....	64
<b>2.3 MULTIPLICAÇÃO A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS E APICAIS .....</b>	<b>65</b>
<b>2.4 ALONGAMENTO .....</b>	<b>66</b>
2.4.1 Uso de benzilaminopurina em meio WPM .....	66

2.4.2 Uso de ácido giberélico em meio WPM.....	66
<b>2.5 ENRAIZAMENTO .....</b>	<b>67</b>
<b>2.6 ACLIMATIZAÇÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>68</b>
<b>2.8 CONDIÇÕES DE CULTURA .....</b>	<b>68</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>3.1 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS .....</b>	<b>69</b>
3.1.1 Uso de cloreto de mercúrio na desinfestação de segmentos nodais .....	69
3.1.2 Adição de PPM™ no meio de cultura.....	70
3.1.3 Efeito de antioxidantes e adsorventes adicionados ao meio de cultura WPM na oxidação de segmentos nodais .....	72
<b>3.2 MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>3.4 ALONGAMENTO .....</b>	<b>76</b>
3.4.1 Uso de benzilaminopurina em meio WPM .....	76
3.4.2 Uso de ácido giberélico em meio WPM.....	77
<b>3.5 ENRAIZAMENTO .....</b>	<b>77</b>
<b>3.6 ACLIMATIZAÇÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>87</b>
<b>ANÁLISE GENÉTICA DA CAPACIDADE DE ENRAIZAMENTO DE CULTURAS <i>IN VITRO</i> DE <i>Calophyllum brasiliense</i> (CAMBESS.) A PARTIR DO USO DE MARCADORES RAPD (<i>Random amplified polymorphic DNA</i>).....</b>	<b>87</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>87</b>
<b>CHAPTER 3 .....</b>	<b>88</b>
<b>GENETIC ANALYSIS OF ROOTING CAPACITY OF <i>IN VITRO</i> CULTURES OF <i>Calophyllum brasiliense</i> (CAMBESS.) USING RAPD (<i>Random amplified polymorphic DNA</i>) MARKERS.....</b>	<b>88</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>88</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>90</b>
<b>2.1 MATERIAL VEGETAL .....</b>	<b>90</b>
<b>2.1 EXTRAÇÃO DE DNA FOLIAR .....</b>	<b>91</b>
2.1 Plantas mantidas em casa de vegetação.....	91

2.2 Plantas micropropagadas.....	91
<b>2.2 ANÁLISE DE RAPD.....</b>	<b>92</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>3.1 EXTRAÇÃO DE DNA FOLIAR .....</b>	<b>94</b>
<b>3.2 ANÁLISE UPGMA .....</b>	<b>95</b>
<b>3.3 ANÁLISE NJ .....</b>	<b>97</b>
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>105</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

*Calophyllum* L. é um gênero tropical composto por mais de 100 espécies, distribuídas na América, Ásia, Madagascar e Austrália, sendo *C. brasiliense* a espécie mais importante da América (FLORES, 2002). Devido à sua tolerância a inundações periódicas e hipoxia (MARQUES e JOLY, 2000b; LORENZI, 2008), esta espécie apresenta potencial para reposição de mata ciliar (NERY *et al.*, 2007b). Segundo Flores (2002), sua madeira é de boa qualidade, podendo substituir esteticamente o mogno (*Swietenia macrophylla*) e cedro (*Cedrela* spp.). Além disso, o guanandi é utilizado para fins medicinais, no tratamento contra úlceras, câncer, vírus HIV e do herpes, *Helicobacter pylori* e *Leishmania amazonensis* (ITO *et al.*, 2002; NOLDIN *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2009; BRENZAN *et al.*, 2012).

De acordo com Scarano *et al.* (1997), o guanandi desenvolve-se apenas por meio de sementes em seu ambiente natural. Sua frutificação, porém, ocorre em intervalos irregulares e a taxa de sobrevivência das sementes na natureza é baixa, não atingindo 40% (KING, 2003), dificultando sua produção em larga escala (FISCHER e DOS SANTOS, 2001).

A técnica da cultura de tecidos é utilizada para regenerar plantas inteiras a partir de células, tecidos ou órgãos, sob condições axênicas (*in vitro*) e, baseando-se na propriedade de totipotência das células vegetais, apresenta vantagens em relação a outros sistemas de propagação (ILIEV *et al.*, 2010). A micropropagação compreende três estágios principais: 1. Estabelecimento da cultura asséptica, a partir de uma fonte de explantes inicial; 2. Multiplicação dos propágulos, de forma a aumentar o número de órgãos e outras estruturas que originarão novas plantas e 3. Reestabelecimento no solo de uma grande quantidade de plantas, após enraizamento e aclimatização (MURASHIGE, 1974).

As vantagens da cultura de tecidos sobre métodos tradicionais incluem o uso de pequenas porções de tecido (explantes) para estabelecimento das culturas, necessidade de pouco espaço, redução ou eliminação da contaminação viral recorrente em algumas espécies, controle eficiente dos fatores que influenciam a regeneração das plantas, como luz e temperatura, produção de clones de plantas difíceis de serem propagadas vegetativamente, regeneração independente de variações sazonais, entre outros (GEORGE e DEBERGH, 2008). Nesse contexto, a

micropropagação surge como uma alternativa para contornar a dificuldade de obtenção de grande número de plantas a partir de poucas matrizes, especialmente para espécies com dificuldade de propagação por outros métodos (GEORGE, 2008; ERIG e SCHUCH, 2005).

Não há nenhum artigo publicado sobre germinação *in vitro* ou micropropagação de *Calophyllum brasiliense*. Protocolos de micropropagação de *C. inophyllum*, a partir de plantas germinadas *in vitro* (THENGANE *et al.*, 2006), e de *C. apetalum*, a partir de segmentos nodais (NAIR e SEENI, 2003), já foram desenvolvidos. Esses procedimentos apresentam grande potencial para o aumento da propagação da espécie que, embora não esteja na lista de plantas ameaçadas de extinção, é grandemente explorada devido à qualidade de sua madeira (KALIL FILHO *et al.*, 2007). Além disso, a produção rápida de mudas é importante, já que a planta pode ser utilizada em programas de reflorestamento para recuperação ambiental em áreas de solo encharcado (LORENZI, 2008).

O objetivo do presente trabalho foi obter a propagação de guanandi, por meio de germinação *in vitro* de suas sementes e micropropagação a partir de segmentos nodais, para estabelecer culturas axênicas, e estabelecer cada uma das etapas da micropropagação, como multiplicação, alongamento e enraizamento, de modo a obter o maior número de plantas em menor tempo. Outro objetivo foi caracterizar esse material vegetal mediante marcadores moleculares RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O GUANANDI

O guanandi (*Calophyllum brasiliense*), espécie arbórea pertencente à família Clusiaceae, é conhecido popularmente por diversos nomes, como olandi, olandim, galandim, jacareúba, gulande-carvalho e mangue (LORENZI, 2008). A planta ocorre desde o México, através da América Central e das Antilhas, até a América do Sul, sendo encontrada em solos ricos em ferro e alumínio e pobres em potássio e fósforo (CARVALHO, 2003).

O guanandi é uma planta perenifólia, heliófita ou de luz difusa, característica de florestas pluviais de solos úmidos e brejosos, encontrada tanto em floresta primária densa como em vários estágios de sucessão secundária, podendo crescer dentro d'água e em áreas de mangue (LORENZI, 2008). Segundo Marques e Joly (2000b), as plantas jovens apresentam grande tolerância à hipoxia, inclusive em tratamentos com água parada, sendo essa condição parcialmente mantida no indivíduo adulto.

Sua madeira é considerada de boa qualidade, sendo a espécie a primeira madeira-de-lei do Brasil, uma vez que no governo imperial, no século XIX, era usada na construção naval (SOUZA e LORENZI, 2008). Sua madeira resistente é considerada imputrescível dentro d'água (CARVALHO, DA SILVA e DAVIDE, 2003). De acordo com Nery *et al.* (2007b), a espécie é indicada para reposição de mata ciliar em locais sujeitos a inundações periódicas de média a longa duração, bem como em solo encharcado.

O extrato da casca de guanandi apresenta propriedades cicatrizantes e antibacterianas, mostrando-se eficiente no tratamento de úlceras e combate de *Helicobacter pylori* (SOUZA *et al.*, 2009). Em estudo de Ito *et al.* (2002), notou-se que uma das xantoninas extraídas de sua casca apresenta até 100% de inibição sobre células pré-cancerígenas. Suas folhas possuem ação contra o protozoário *Leishmania amazonensis*, tanto na forma livre quanto intracelular (BRENZAN *et al.*, 2012). Além disso, o guanandi possui ação inibitória contra a replicação dos vírus HIV e do herpes e contra atividade bacteriana em todas as gram-positivas e algumas cepas de gram-negativas (NOLDIN *et al.*, 2006).



Segundo Scarano *et al.* (1997), *Calophyllum brasiliense* é uma espécie de dossel que não apresenta propagação vegetativa natural, sendo produzida apenas por meio de sementes. Em estudo de Silva (1998), estacas de guanandi não enraizaram, mesmo com aplicação exógena de auxinas, ocorrendo abscisão foliar, ressecamento e esgotamento de suas reservas nutricionais.

Os frutos de guanandi são do tipo baga, globosos, com pericarpo carnoso e oleaginoso de cor amarelada (SOUZA e LORENZI, 2008). Eles apresentam de 2,5 a 3 cm de diâmetro, sendo esverdeados quando imaturos. Seu exocarpo é coriáceo, fino e com manchas glandulares. O mesocarpo é carnoso, esbranquiçado e se torna amarelo com a maturidade, com textura granulosa. O endocarpo é fino e se fragmenta quando o fruto está maduro (FLORES, 2002).

As sementes, de cerca de 2 cm de diâmetro, são ovóides ou globulosas, com tegumento marrom, testa grossa, dura e irregular; o tégmen é fino, e algumas vezes se fragmenta quando a semente está madura. Elas apresentam um pequeno hilo contendo a micrópila, e não contêm endosperma e perisperma quando maduras. Os cotilédones são largos, carnosos e oleaginosos (FLORES, 2002). As sementes de *Calophyllum brasiliense* são dispersas por morcegos, especialmente do gênero *Artibeus*, que se alimentam da polpa ou, durante o período chuvoso, são dispersas pela água (FISCHER e DOS SANTOS, 2001; MARQUES e JOLY, 2000a).

As sementes não germinam em solo encharcado, mantendo-se viáveis sob estas condições por pelo menos três meses e germinando quando em solo drenado. De acordo com Souza e Lorenzi (2008), a germinação das sementes intactas ocorre em 40 a 60 dias, com taxas superiores a 50%. Em estudo de Marques e Joly (2000b), mais de 75% das sementes em seu ambiente natural germinaram após 12 semanas. A luz não pareceu interferir no processo, já que as taxas de germinação foram praticamente iguais em condições de claro ou escuro. Em testes de Scarano *et al.* (1997), 60% das sementes sem pericarpo germinaram em duas semanas, enquanto apenas 18% dos frutos intactos germinaram no mesmo período. Há evidências de que a espécie apresenta dois tipos de dormência: uma imposta pelo pericarpo do fruto (pré-dispersão) e outra após a dispersão das sementes, imposta pelo endocarpo (SCARANO *et al.*, 1997).

O endocarpo dos frutos de *Calophyllum brasiliense* contém uma espessa camada de esclerênquima, que pode atuar como barreira à retomada do crescimento do embrião durante a germinação das sementes (NERY *et al.*, 2007a).

Assim, o endocarpo pode dificultar a embebição das sementes e as trocas gasosas, retardando ou até mesmo impedindo sua germinação (POPINIGIS, 1985). Segundo Flores (2002), manter as sementes imersas em água por 24 h pode amolecer o endocarpo e contribuir para uma germinação uniforme, diminuindo também o número de plântulas com desenvolvimento anormal da plúmula.

Embora a espécie apresente altas taxas de germinação em seu ambiente natural, o estabelecimento das plântulas de guanandi é baixo. Em estudo de King (2003), as sementes foram semeadas em solo de floresta e, apesar da taxa de germinação atingir até 95%, todas as plântulas foram danificadas ou consumidas por herbívoros, possivelmente mamíferos.

A elevada mortalidade das plântulas também é apontada por Fischer e Dos Santos (2001), em estudo em que 57% das plântulas (até 0,4 m) crescendo em solo alagado morreram em um ano, comparado a 6,4% das plantas imaturas (1 a 3 m). A mortalidade em solo alagável pode alcançar taxas até três vezes maiores, devido ao soterramento das plântulas como consequência da variação do leito dos rios, comum em áreas ciliares (MARQUES e JOLY, 2000a).

O intervalo de tempo entre dois episódios de frutificação consecutivos também é limitante para a obtenção de sementes da espécie, chegando a 41 meses (FISCHER e DOS SANTOS, 2001). O florescimento e a frutificação do guanandi são supra anuais e ocorrem em eventos irregulares (FARIA, 2008; NEWSTROM e FRANKIE, 1994). O padrão de frutificação imprevisível favorece a sobrevivência das flores e sementes, uma vez que impede a especialização de predadores, ou seja, estas estruturas tendem a ser consumidas apenas por animais generalistas (FISCHER e DOS SANTOS, 2001). Esta característica, porém, reduz a disponibilidade de sementes para propagação da espécie.

O armazenamento de sementes de guanandi é uma alternativa inviável para sua propagação, pois as mesmas são classificadas como recalcitrantes, impedindo sua conservação *ex situ* por meio de bancos de sementes (CARVALHO, 2006). Em estudos de Nery *et al.* (2007b), sementes acondicionadas em sacos de papel perdem a capacidade de germinar após 9 meses sob tais condições.

A germinação *in vitro* do guanandi pode aumentar as taxas de estabelecimento da espécie, sendo alternativa para obter um maior número de plantas em menor tempo e sob condições assépticas. A estratégia também é eficiente para evitar a alta mortalidade das plantas no início de seu desenvolvimento.

Um protocolo para germinação *in vitro* já foi estabelecido para *Calophyllum inophyllum* (THENGANE *et al.*, 2006). Outra possibilidade de produção de um grande número de indivíduos é a micropropagação, já realizada para *C. apetalum* (NAIR e SEENI, 2003).

## 2.2 MICROPROPAGAÇÃO

### 2.2.1 Conceitos gerais

A cultura de tecidos é uma técnica utilizada para promover o crescimento de células, tecidos ou órgãos vegetais sob condições axênicas, de modo a regenerar e propagar plantas inteiras (ILIEV *et al.*, 2010). O uso da cultura de tecidos para a propagação de plantas é a aplicação mais amplamente utilizada desta tecnologia (SMITH, 2000).

A micropropagação permite a propagação clonal de genótipos superiores e plantas economicamente importantes (ILIEV *et al.*, 2010). De acordo com Erig e Schuch (2005), este método apresenta inúmeras vantagens, dentre elas a possibilidade de obter diversas plantas a partir do explante inicial, independente da estação do ano; a redução do tempo e área necessários à propagação; melhores condições sanitárias; propagação do genótipo da planta matriz com considerável fidelidade e propagação de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos.

Segundo George e Debergh (2008), a micropropagação pode ser dividida nos seguintes estágios: 0) seleção e preparação da planta-matriz, etapa em que se identificam plantas livres de contaminantes e as melhores fontes de explantes; i) estabelecimento de cultura asséptica, a transferência do explante para o meio de cultura; ii) produção de propágulos adequados, quando ocorre a produção massiva de gemas, a partir da adição de citocininas ao meio de cultura; iii) preparação para crescimento no ambiente natural, diminuindo-se as concentrações de carboidratos no meio e promovendo o enraizamento por meio do uso de auxinas; iv) transferência ao ambiente natural, ou aclimatização, que ocorre pela adaptação progressiva dos explantes ao ambiente *ex vitro*.

A porção de tecido vegetal (explante) utilizada para a cultura *in vitro* varia conforme a finalidade da cultura e a espécie (SMITH, 2000). Um dos tipos de explantes comuns consiste em segmentos nodais, porções de ramos contendo uma ou mais gemas laterais a partir dos quais ocorre a proliferação de brotações, mediante a adição de concentrações relativamente altas de citocininas (ILIEV *et al.*, 2010). Segundo George e Debergh (2008), segmento nodal é o tipo mais simples de explante, requerendo apenas que ocorra o desenvolvimento das gemas.

No caso de plantas lenhosas, a utilização de segmentos nodais é indicada a fim de estimular o desenvolvimento das gemas e contornar a recalcitrância da maioria destas espécies, eliminando problemas associados à dormência, crescimento sazonal e desenvolvimento lento (SMITH, 2000).

A idade do explante e o grau de diferenciação dos tecidos influenciam a produtividade da micropropagação (GAHAN e GEORGE, 2008). Segundo Smith (2000), tecidos fisiologicamente jovens são geralmente muito mais responsivos *in vitro*, além de apresentarem maior facilidade no estabelecimento de culturas assépticas.

### 2.2.2 Desinfestação do material vegetal

Tecidos muito jovens, apesar de mais responsivos, são mais susceptíveis à toxicidade dos agentes desinfestantes, que podem danificar os explantes, sendo que o uso de menores concentrações é preferível (SMITH, 2000). Nair e Seeni (2003) cultivaram segmentos nodais e apicais de *Calophyllum apetalum* de diferentes idades introduzidos em meio de cultura MS. Os explantes muito jovens (até duas semanas) necrosaram nos primeiros dez dias, enquanto as maiores taxas de sobrevivência (até 70%) foram observadas nos explantes com idade de seis a oito semanas.

As plantas lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro* por serem comumente infectadas por microrganismos, processo em que podem ocorrer danos ou mesmo morte do tecido (ANDRADE *et al.*, 2000). A utilização de sementes é preferível quando se deseja reduzir a contaminação, pois contém menor quantidade de microrganismos endógenos (SMITH, 2000). A propagação vegetativa,

todavia, apresenta vantagens devido à possibilidade de obtenção de plantas geneticamente semelhantes à planta matriz (GEORGE, 2008).

Na desinfestação de segmentos nodais de *Garcinia quaesita*, outra Clusiaceae, o uso de hipoclorito de sódio não foi suficiente para evitar a proliferação de microrganismos nos explantes, tornando-se necessário o uso de 0,5% de cloreto de mercúrio, produto altamente tóxico, para reduzir a contaminação (FARZANA *et al.*, 2010). O uso de segmentos nodais obtidos a partir de germinação *in vitro* resultou em 100% de sobrevivência dos explantes, mostrando que essa fonte de explantes é mais vantajosa se comparada aos explantes obtidos a partir de mudas cultivadas em casa de vegetação.

### 2.2.3 Germinação *in vitro* de sementes

No caso da germinação *in vitro* de sementes de *Calophyllum inophyllum*, o meio de cultura WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) é mais eficiente que o MS, proporcionando até 78% de germinação, enquanto um máximo de 42% foi atingido utilizando meio MS (THENGANE *et al.*, 2006). Nas sementes que foram submersas em água por 24 horas antes do estabelecimento *in vitro*, não houve escurecimento e as taxas de germinação foram de 78%. No entanto, sementes submersas por um período superior a 24 horas não apresentaram aumento nas taxas de germinação, além de resultar em contaminação das culturas (THENGANE *et al.*, 2006).

Apesar da ausência de testes de germinação *in vitro* de guanandi, alguns estudos *ex vitro* foram realizados. Marques e Joly (2000b) observaram que as sementes de guanandi germinam lentamente, tanto em solo de floresta quanto em areia esterilizada, independente da escarificação ou não das sementes. As sementes com tegumento apresentam tempo médio de germinação de até 33 dias, comparando-se a 8 dias no caso de sementes cujo tegumento foi removido (NERY *et al.*, 2007b).

#### 2.2.4 Multiplicação de brotações

Dentre as citocininas adicionadas ao meio de cultura para obtenção de grande número de brotações, a 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina, zeatina e 6- $\gamma$ - $\gamma$ -(dimetilalilamino)-purina (2-iP) induzem a multiplicação de gemas axilares ou adventícias (ILIEV *et al.*, 2010).

Na indução da multiplicação de brotações em *C. apetalum*, BAP se mostrou mais efetiva que a cinetina, com concentrações ótimas de 8,8 e 4,4  $\mu$ M para os segmentos nodais e apicais, respectivamente. O número de brotações por explante também foi maior com o uso de BAP (até 3,2), comparado ao máximo de 2,1 com o uso de cinetina (NAIR e SEENI, 2003).

Durante a multiplicação de segmentos nodais de *Garcinia indica*, a adição de cinetina induziu poucas gemas (15,7), se comparada a até 41,8 gemas utilizando-se a mesma concentração de BAP (MALIK *et al.*, 2005). Além disso, baixas concentrações de tidiazuron (TDZ; 0,1 a 12,5  $\mu$ M) foram tão eficientes quanto maiores concentrações de BAP (5 a 50  $\mu$ M). O TDZ, porém, reduziu o alongamento das mesmas, causando até mesmo necrose (MALIK *et al.*, 2005). Este regulador apresenta uma atividade maior e, em algumas plantas, é mais efetivo que outras citocininas na indução e proliferação de gemas (VAN STADEN, ZAZIMALOVA e GEORGE, 2008). Contudo, não apenas estimula a multiplicação de gemas, como também a formação de calos e gemas adventícias, podendo resultar em variação somaclonal, além de inibição do alongamento das brotações e enraizamento do explante (HUETTEMAN e PREECE, 1993).

Assim, baixas concentrações de TDZ (0,91  $\mu$ M) utilizadas durante a multiplicação de brotações em *Calophyllum inophyllum*, mostraram-se tão efetivas quanto as maiores concentrações de 6-benzilaminopurina (40  $\mu$ M) durante os primeiros 60 dias de tratamento. Após esse período, o TDZ induziu até 20 brotações por explante, enquanto no tratamento com BAP, o número máximo de brotações foi 13. Entretanto, efeitos residuais de TDZ retardaram em até dois meses o alongamento dos explantes, fato não observado com o uso de BAP (THENGANE *et al.*, 2006).

### 2.2.5 Enraizamento

Segundo Smith (2000), uma auxina exógena é necessária para a iniciação de raízes na maioria das espécies, sendo utilizados o ácido indol-3-acético (AIA), ácido indolil-3-butírico (AIB) ou ácido naftalenoacético (ANA). O ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), apesar de também ser um regulador auxínico, é utilizado essencialmente para a indução de calos. Em altas concentrações, ANA também passa a induzir a formação de calos na base do explante, indesejáveis na micropropagação de segmentos nodais (MACHAKOVA, ZAZIMALOVA e GEORGE, 2008).

No caso de segmentos nodais de *C. apetalum*, as melhores respostas rizogênicas (56%) foram obtidas nos explantes suplementados com 9,8 µM de AIB, enquanto ANA induziu a formação de calos e inibiu o crescimento das plantas (NAIR e SEENI, 2003).

Em explantes derivados de sementes de *Garcinia indica*, o enraizamento foi mais eficiente com 9,8 µM de AIB (57%) do que com 10,74 µM de ANA (28%), sendo que este regulador induziu a formação de calos, dificultando as conexões vasculares entre raiz e porção aérea (CHABUKSWAR e DEODHAR, 2005). Em outro estudo com essa espécie, concentrações de 10 µM de AIB e ANA induziram o enraizamento de brotações sem formação de calos intermediários, sendo as raízes produzidas em meio suplementado com AIB mais finas e longas (MALIK *et al.*, 2005).

Elevadas concentrações de citocininas geralmente inibem a formação de raízes, prevenindo o efeito de auxinas. Por esta razão, geralmente não são adicionadas durante o enraizamento dos explantes. Apesar disso, existem casos em que baixas concentrações deste regulador podem ser adicionadas ao meio de cultura, com bons resultados de enraizamento (VAN STADEN, ZAZIMALOVA e GEORGE, 2008). Para o enraizamento de explantes de *C. inophyllum* em meio WPM ou WPM/2, o uso de menor concentração de AIB (2,46 µM) mostrou-se mais eficiente do que a combinação de AIB com 2,22 µM de BAP (THENGANE *et al.*, 2006).

### 2.2.6 Aclimatização

Após o enraizamento dos explantes, os métodos pelos dos quais as plantas são transferidas do ambiente *in vitro* para *ex vitro* são extremamente importantes e, se não for realizada cuidadosamente, a transferência pode resultar em perda significativa de material propagado (GEORGE e DEBERGH, 2008).

Na micropropagação de *Garcinia indica*, plantas enraizadas transferidas para vasos contendo uma mistura estéril de areia e solo (1:1) em casa de vegetação mostraram 90% de sobrevivência, comparado a 72% no caso das plantas transferidas diretamente para campo aberto (DEODHAR, THENGANE e THENGANE, 2008).

Plantas enraizadas de *C. apetalum*, transferidas diretamente para casa de vegetação, foram perdidas devido à necrose apical. As plantas rustificadas por quatro semanas sob alta umidade perderam as folhas, mas produziram novas em quatro semanas. Comparando-se os dados de crescimento entre plantas micropropagadas e sementes, em seu hábitat nativo, a altura e diâmetro caulinar foram semelhantes e não houve anormalidades morfológicas (NAIR e SEENI, 2003).

Durante a transferência de plantas enraizadas de *C. inophyllum*, uma mistura de solo, casca de coco e areia (1:2:1) foi utilizada e a aclimatização ocorreu em casa de vegetação a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com 80% de umidade relativa, resultando em 77% de sobrevivência após cinco semanas (THENGANE *et al.*, 2006).

Para *Garcinia indica*, as maiores taxas de sobrevivência foram observadas em substrato de casca de coco e na mistura casca de coco com areia (76,2 e 75%, respectivamente), se comparado à mistura de casca de coco, areia e solo (67%). Além disso, em casca de coco, novas folhas apareceram após 10 dias, enquanto nos demais substratos as folhas surgiram apenas após 17 dias (CHABUKSWAR e DEODHAR, 2005).

## 2.3 ANÁLISE MOLECULAR

Marcadores utilizando DNA se tornaram o tipo de marcador de escolha para estudo de diversidade genética de plantas cultivadas, revolucionando a biotecnologia vegetal (KUMAR *et al.*, 2009). Marcadores moleculares podem ser



utilizados para mapear os genes envolvidos na competência *in vitro* das plantas, uma vez que tal capacidade é um traço herdável (HENRY, VAIN e DE BUYSER, 1994). Tais análises já foram aplicadas para várias espécies como *Populus deltoides* (RANI, PARIDA e RAINA, 1995), *Linum usitatissimum* (CHAKRAVARTY e SRIVASTAVA, 1997), *Vigna unguiculata* (BRAR *et al.*, 1999), *Hypericum perforatum* (GOEL, KUKREJA e BISHT, 2006), *Sorghum bicolor* (ARULSELVI e KRISHNAVENI, 2009), *Solanum melongena* (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2010), *Gypsophila paniculata* (BARAKAT e EL-SAMMAK, 2011) e *Prunus armeniaca* (SOLIMAN, 2012).

Um marcador molecular considerado 'ideal' deve apresentar algumas propriedades desejáveis, tais como: alta natureza polimórfica, herança codominante, ocorrência frequente no genoma, comportamento neutro às condições ambientais, ser de fácil acesso, com análise rápida e alta reprodutibilidade (KUMAR *et al.*, 2009). É extremamente difícil encontrar um marcador molecular que se adeque a todos esses critérios, portanto dependendo do tipo de estudo e organismo utilizado deve-se buscar o marcador que atenda à maior parte dos critérios. De maneira geral, o genoma de espécies florestais nativas é pouco conhecido, então qualquer técnica que dependa de conhecimento prévio desse genoma é pouco eficiente. Para esse tipo de material, uma alternativa seria utilizar marcadores mais baratos e simples, que não dependam de conhecimento prévio sobre o genoma do organismo a ser estudado.

Os marcadores moleculares RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) baseiam-se na tecnologia da PCR (reação de cadeia de polimerase) (KUMAR *et al.*, 2009). São oligonucleotídeos decâmeros que, devido ao seu pequeno tamanho, ligam-se a muitos loci da amostra de DNA (SENTHIL KUMAR e GURUSUBRAMANIAN, 2011). As vantagens dessa técnica incluem a simplicidade, eficiência, baixo custo se comparada ao uso de outros marcadores, rapidez e o fato de dispensar conhecimento prévio sobre o genoma do organismo a ser estudado (LYNCH e MILLIGAN, 1999; BARDAKCI, 2001; KUMAR *et al.*, 2009; SENTHIL KUMAR e GURUSUBRAMANIAN, 2011). Para o guanandi, marcadores RAPD já foram utilizados para analisar populações naturais da espécie (SCHÜHLI *et al.*, 2013).

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174 - 180, 2000.
- ARUSELVI, I.; KRISHNAVENI, S. Effects of hormones, explants and genotypes in *in vitro* culturing of sorghum. **Journal of Biochemical Technology**, v.1, n.4, p.96-103, 2009.
- BARAKAT, M. N.; EL-SAMMAK, H. In vitro mutagenesis, plant regeneration and characterization of mutants via RAPD analysis in Baby's breath *Gypsophila paniculata* L. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.2, p.214-222, 2011.
- BRAR, M. S.; AL-KHAYRI, J. M.; MORELOCK, T. E.; ANDERSON, E. J. Genotypic response of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) to *in vitro* regeneration from cotyledon explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.35, n.8, p.8-12, 1999.
- BRENZAN, M. A.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M. C. M.; CÔRREA, A. G.; ALVIM JÚNIOR, J.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; CORTEZ, D. A. G. Effects of (-) mammea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. **Phytomedicine**, v.19, p.223-230, 2012.
- CARVALHO, L. R.; DA SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação das sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista brasileira de sementes**, Pelotas, v.28, n.2, p.15-25, 2006.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Vol. 1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.
- CHABUKSWAR, M. M.; DEODHAR, M. A. Rooting and hardening of *in vitro* plantlets of *Garcinia indica* Choisy. **Indian Journal of Biotechnology**, v.4, p.409-413, 2005.
- CHAKRAVARTHI, B.; SRIVASTAVA, S. Effects of genotype and explant during *in vitro* response to cadmium stress and variation in protein and proline contents in linseed. **Annals of Botany**, v.79, p.487-491, 1997.
- CHAKRAVARTHI, D. V. N.; INDUKURI, V.; GOPARAJU, U. A.; YECHURI, V. Effect of genotype, explant and hormonal concentration on *in vitro* response of eggplant. **Notulae Scientia Biologicae**, v.2, n.3, p.77-85, 2010.
- DEODHAR, S. R.; THENGANE, R. J.; THENGANE, S. R. *De novo* shoot regeneration from root cultures of *Garcinia indica* Choisy. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.46, p.482-486, 2008.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, 2005.

FARIA, M. B. B. C. **Diversidade e regeneração natural de árvores em florestas de restinga na Ilha do Cardoso, Cananéia, SP, Brasil**. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ecologia) – Departamento de Ecologia Geral, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FARZANA, A. F. R.; BANDARA, R. M. I. E. K.; ALUWIHARE, P. C.; EESWARA, J. P. In vitro regeneration of shoots from *Garcinia quaesita* leaf explants. **Journal of Natural Science Foundation of Sri Lanka**, v.38, n.3, p.157-162, 2010.

FISCHER, E.; DOS SANTOS, F. A. M. Demography, phenology and sex of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) trees in the Atlantic forest. **Journal of Tropical Ecology**, v. 17, p.903-909, 2001.

FLORES, E. M. *Calophyllum brasiliense* Cambess. In: VOZZO, J. A. (Ed.). **Tropical tree seed manual**. Washington: USDA Forest Service, 2002. p. 353-356.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure – background In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GEORGE, E. F. DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GOEL, M.K.; KUKREJA, A. K.; BISHT, N. S. In vitro manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.96, p.1-9, 2009.

HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v.79, p.45-58, 1994.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant cell, tissue and organ culture**, v.33, n.2, p.105-119, 1993.

ILIEV I.; GAJDOSOVÁ, A.; LIBIAKOVÁ, G.; JAIN, S. M. Plant micropropagation In: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. (Ed.). **Plant cell culture: essential methods**. Garsington Road, Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 1-23.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; FILHO, V. C.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis*: structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v.65, p.267-272, 2002.

KALIL FILHO, A. N. K.; MARZOLLO, L. G.; LOPES, A. J.; WENDLING, I. Produção de mudas de guanandi. Embrapa, Colombo, Comunicado Técnico, ago. 2007.

KING, R. Succession and micro-elevation effects on seedling establishment of *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) in an Amazonian river meander forest. **Biotropica**, v.35, n.4, p.462-471, 2003.

KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics Journal**, v.2, n.4, p.141-162, 2009,

LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation**, v.30, p.421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol 1. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v.3, p. 91-99, 1994.

MACHAKOVA, I.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators I: introduction; Auxins, their analogues and inhibitors *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

MALIK, S. K.; CHAUDHURY, R.; KALIA, R. K. Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: a tropical medicinal tree species. **Scientia Horticulturae**, v.106, p.539-553, 2005.

MARQUES, M. C. M.; JOLY, C. A. Estrutura e dinâmica de uma população de *Calophyllum brasiliense* Camb. em floresta higrófila do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.23, n.1, p.107-112, 2000a.

MARQUES, M. C. M.; JOLY, C. A. Germinação e crescimento de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma espécie típica de florestas inundadas. **Acta Botânica Brasílica**, Brasília, v.14, n.1, p.113-120, 2000b.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

NAIR, L. G.; SEENI, S. *In vitro* multiplication of *Calophyllum apetalum* (Clusiaceae), an endemic medicinal tree of the Western Ghats. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.78, n.2, p.169-174, 2003.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F.; CASTRO, E. M.; STEIN, V. C. Caracterização morfológica e química das sementes de *Calophyllum brasiliense* Cambess. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p. 144-146, 2007a.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F.; DOUSSEAU, S.; VIEIRA, C. V. Efeito da temperatura e do tegumento na germinação de sementes de *Calophyllum brasiliense*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1872-1877, 2007b.

NEWSTROM, I. E.; FRANKIE, G. W. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical forest trees at La Selva, Costa Rica. **Biotropica**, v.26, p.141-159, 1994.

NOLDIN, V. F.; ISAÍAS, D. B.; FILHO, V. C. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Química Nova**, v.29, n.3, p.549-554, 2006.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília, 1985.

RANI, V.; PARIDA, A.; RAINA, S. N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. **Plant Cell Reports**, v.14, p.459-462, 1995.

SCARANO, F. R. RIBEIRO, K. T. MORAES, L. F. D.; LIMA, H. C. Plant establishment on flooded and unflooded patches of a freshwater swamp forest in southeastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v.13, n.6, p. 793-803, 1997.

SCHÜHLI, G. S.; OLIVEIRA, T. W. G.; OLIVEIRA, M. S. P.; FOWLER, J. A. P. Genetic selection of *Calophyllum brasiliense* for seed orchards. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.4, p.371-377, 2013.

SENTHIL KUMAR, N.; GURUSUBRAMANIAN, G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. **Science Vision**, v.11, n.3, p.116-124, 2011.

SILVA, M. N. **Enraizamento de estacas de seis espécies nativas de mata de galeria: *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud., *Calophyllum brasiliense* Camb., *Copaifera langsdorfii* Desf., *Inga laurina* (Sw.) Willd., *Piper arboreum* Aubl. e *Tibouchina stenocarpa* (DC.) Cogn.** 132 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 1998.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. 2ª ed, San Diego, CA: Academic Press, 2000.

SOLIMAN, H. I. A. In vitro propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) and assessment of genetic stability of micropropagated plants using RAPD analysis. **World Applied Sciences Journal**, v.19, n.5, p.674-687, 2012.

SOUZA, M. C.; BESERRA, A. M. S.; MARTINS, D. C.; REAL, V. V.; DOS SANTOS, R. A. N.; RAO, V. S.; DA SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.452-458, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2ª ed. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2008.

THENGANE, S. R.; BHOSLE, S. V.; DEODHAR, S. R.; PAWAR, K. D.; KULKARNI, D. K. Micropropagation of Indian laurel (*Calophyllum inophyllum*), a source of anti-HIV compounds. **Current Science**, v.90, n.10, p.1393-1397, 2006.

VAN STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

## CAPÍTULO 1

### GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* Cambess.)

#### RESUMO

O guanandi é uma espécie arbórea que apresenta madeira de boa qualidade e que tem potencial para reposição de mata ciliar e várias propriedades medicinais. A reprodução da espécie na natureza é limitada e a germinação *in vitro* de suas sementes pode ser uma alternativa para obtenção de grande número de mudas, em boas condições fitossanitárias. O objetivo do presente estudo é obter a germinação *in vitro* da espécie. Frutos de guanandi foram despulpados manualmente e o endocarpo foi removido das sementes, que foram introduzidas individualmente em meio WPM. Para a desinfestação, foram testadas concentrações de 0,1 ou 0,2% de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), por 4 ou 8 min, mantendo-as ou não em água destilada por 24 horas antes do processo. Não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações de  $\text{HgCl}_2$  usadas na desinfestação, mas o tempo de exposição maior aumentou a sobrevivência de 48 para 59%. Em um segundo experimento, procedeu-se da mesma maneira, mas o meio de cultura foi acrescido de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de Cercobin®. Houve uma redução na contaminação fúngica de 23 a 6,4% em relação ao experimento anterior, mas aumento na contaminação por bactérias de 24,2 para 36%. A sobrevivência dos explantes foi aumentada de 54,4% (4 min) para 68,9% (8 min de exposição ao  $\text{HgCl}_2$ ). Quando as sementes permaneceram em água antes da desinfestação, a contaminação por fungos aumentou de 3 a 13%, em meio contendo Cercobin®. Foi testada solução a 0,2% de *Plant Preservative Mixture* (PPM™) durante 24 ou 48h, antes da desinfestação, e adição de PPM™ ao meio de cultura, a 0,15% ou 0,2%. A permanência de sementes em solução a 0,2% de PPM™ reduziu a contaminação de 35,6% (controle) para até 13,3% (48 h). Quando PPM™ foi adicionado ao meio de cultura, a contaminação total passou de 38,7% (controle) para 21,3% (0,2% de PPM™). Em outro experimento, as sementes permaneceram em água ou solução de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ), em concentrações de 2,89 a 28,89  $\mu\text{M}$ , durante 24 ou 48 horas. O maior tempo de exposição ao  $\text{GA}_3$  foi prejudicial, reduzindo a germinação de 70,6% (24h) para 60% (48h). O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foi incrementado em até 17% com o uso de concentrações de 5,57 e 14,47  $\mu\text{M}$ . Conclui-se que a germinação *in vitro* de sementes de guanandi é possível e viável, alcançando-se até 93,3% de sobrevivência das mesmas após permanência em PPM™ a 0,2% por 48 horas antes da desinfestação e adição de 0,2% do biocida ao meio de cultura, com germinação a partir de 6 dias de introdução.

Palavras-chave:  $\text{GA}_3$ , IVG, meio WPM, PPM™, sementes.

## CHAPTER 1

### **IN VITRO GERMINATION OF GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* Cambess.)**

#### **ABSTRACT**

Guanandi is a tree species with good timber and various medicinal properties that has potential for replacement of riparian vegetation. The natural reproduction of this species is limited and *in vitro* germination of the seeds may be an alternative for obtaining seedlings, in good phytosanitary conditions. The present study aimed to obtain *in vitro* germination of seeds of this species. Guanandi fruits were pulped manually, the endocarp was removed and the seeds were introduced individually in WPM medium. For surface-sterilization, mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) was tested for 4 or 8 min, at a 0.1 or 0.2% concentration. The seeds were maintained in distilled water for 24 hours before the procedure and a control without imbibition. There were no significant differences between the results when different concentrations of HgCl<sub>2</sub> were used, but the longest exposure time increased survival rates from 48% up to 59%. In a second experiment, we proceeded in the same manner but the culture medium was supplemented with 0.5 g.L<sup>-1</sup> Cercobin®. There was a reduction in fungal contamination from 23 to 6.4% in comparison to the previous experiment, but bacterial contamination was increased from 24.2 to 36%. The survival was increased from 54.4 (4 min) to 68.9% (8 min exposure to HgCl<sub>2</sub>). When seed were kept in water prior to surface-sterilization, the fungal contamination was increased from 3 to 13%, in culture media containing Cercobin®. The seeds were then immersed in a solution at 0.2% Plant Preservative Mixture (PPM™) for 24 or 48 h prior to surface-sterilization, and PPM™ was also added to the culture medium at 0.15 or 0.2%. Seeds permanence in PPM™ solution at 0.2% reduced contamination from 35.6% (control) to 13.3% (48 h). When PPM™ was added to the culture medium, the total contamination was decreased from 38.7% (control) to 21.3% (0.2% PPM™). In another treatment, the seeds were maintained in water or in a gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) solution in concentrations from 2.89 up to 28.89 µM, for 24 or 48 h. The longer exposure to GA<sub>3</sub> was detrimental, reducing the germination from 70.6 (24 h) to 60% (48 h). The Germination Speed Index (GSI) was increased until 17% with the concentrations of 5.57 and 14.47 µM. In conclusion, the *in vitro* germination of *Calophyllum brasiliense* seeds is possible and feasible, reaching high survival rate (up to 93.3%) and started 6 days after *in vitro* introduction.

Keywords: GA<sub>3</sub>, GSI, WPM medium, PPM™, seeds.



## 1 INTRODUÇÃO

*Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae), comumente chamado de guanandi, jacaréúba ou olandi é uma espécie arbórea característica de florestas pluviais e solos úmidos, encontrada em florestas em vários estágios sucessionais, assim como em áreas de mangue, por apresentar grande tolerância a hipóxia (MARQUES e JOLY, 2000b; LORENZI, 2008).

A madeira do guanandi é de boa qualidade, usada inclusive na construção naval, e a espécie apresenta potencial para reposição de mata ciliar (NERY *et al.*, 2007b; SOUZA e LORENZI, 2008). A planta apresenta várias propriedades medicinais, incluindo ação cicatrizante e antibacteriana (SOUZA *et al.*, 2009), inibição de células pré-cancerígenas (ITO *et al.*, 2002) e da replicação do vírus HIV e do herpes (NOLDIN *et al.*, 2006).

A reprodução da espécie na natureza ocorre em intervalos irregulares e seu estabelecimento é baixo, devido à herbivoria e soterramento em locais alagados (NESTROM e FRANKIE, 1994; MARQUES e JOLY, 2000a; FISCHER e DOS SANTOS, 2001; KING, 2003; FARIA, 2008). Segundo Carvalho (2003), as sementes são consideradas recalcitrantes, com pouca possibilidade de armazenamento e, portanto, a disponibilidade das mesmas é baixa, constituindo um fator limitante para sua produção em larga escala.

A cultura de tecidos surge como alternativa para aumentar a produção de mudas da espécie e a germinação *in vitro* desta planta pode ser utilizada para este fim, como no caso de *Calophyllum inophyllum* (THENGANE *et al.*, 2006), sendo aplicada para contornar possíveis dificuldades no estabelecimento de segmentos nodais. A idade do explante e o grau de diferenciação dos tecidos influenciam a produtividade da micropropagação, sendo que tecidos mais jovens são geralmente mais responsivos *in vitro*, com maior facilidade no estabelecimento de culturas assépticas (SMITH, 2000; GAHAN e GEORGE, 2008).

O objetivo geral do presente estudo é obter a germinação *in vitro* de guanandi e estabelecer a etapa de multiplicação de segmentos nodais obtidos das plântulas crescidas *in vitro*. Desta forma, para desenvolvimento do trabalho, foram definidos alguns objetivos específicos:

- Estabelecer culturas assépticas, por meio de adequação do protocolo de desinfestação das sementes de guanandi;

- Determinar a melhor concentração de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a ser adicionada no meio de cultura durante a introdução das sementes *in vitro*, afim de acelerar a germinação.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Os frutos de guanandi foram obtidos do Instituto Brasileiro de Florestas (IBF) com germinação em campo geralmente superior a 50%, segundo dados do vendedor, ou fornecidos pela Embrapa-Florestas, do município de Colombo, PR. Para a germinação *in vitro*, os frutos foram despulpados e o tegumento das sementes foi removido manualmente.

### 2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal, localizado no Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

#### 2.2.1 Desinfestação com hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio

Frutos de guanandi foram despulpados, removendo-se o endocarpo e tegumento manualmente e as sementes foram colocadas em frasco erlenmeyer contendo água destilada autoclavada, por 24 ou 48 horas. Manteve-se um controle sem imersão em água, o qual foi submetido diretamente à desinfestação.

As sementes foram lavadas durante cinco minutos com água corrente e detergente comercial, sendo enxaguadas cinco vezes com água destilada. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas com etanol 70% durante

1 minuto e hipoclorito de sódio (NaOCl) 10%, acrescido de 0,01% de Tween 20®, durante 20 minutos. Posteriormente, foram colocadas em solução de 0,1 ou 0,2% de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>), onde permaneceram por 4 ou 8 minutos, sendo lavadas seis vezes com água destilada autoclavada.

As sementes foram introduzidas individualmente em tubos de ensaio com 15 cm de altura e 2,5 de diâmetro, contendo 10 ml de meio WPM (*“Woody plant medium”*, LLOYD e McCOWN, 1980, ANEXO 1) sem reguladores, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,6% de ágar (Vetec®). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

O delineamento experimental foi trifatorial, considerando-se o tempo de permanência em água (0, 24 ou 48h), a concentração de cloreto de mercúrio (0,1 ou 0,2%) e o tempo de exposição ao HgCl<sub>2</sub> (4 ou 8 minutos). Para cada um dos 12 tratamentos, foram utilizadas cinco repetições, compostas por seis sementes cada.

A porcentagem de contaminação por fungos e bactérias e a sobrevivência foram avaliadas um mês após a introdução *in vitro*.

#### 2.2.2 Adição de Cercobin® ao meio de cultura

Procedeu-se exatamente da mesma maneira que no experimento anterior, porém, acrescentou-se 0,5 g.L<sup>-1</sup> de Cercobin®, um fungicida sistêmico, a todos os meios de cultura WPM antes da autoclavagem.

#### 2.2.3 Tratamento das sementes com PPM™ e imersão em água

Sementes obtidas da Embrapa-Florestas foram colocadas em frascos erlenmeyer contendo água destilada e autoclavada ou solução a 0,2% de *Plant Preservative Mixture* (PPM™, Plant Cell Technology) durante 24 ou 48h, mantendo-se um controle sem permanência em água.

Após os tratamentos, as sementes foram lavadas com água e detergente por 5 minutos e, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas com etanol 70% por 1 minuto, NaOCl 5% adicionado de 0,01% de Tween 20® por 20 minutos e solução a 0,1% de HgCl<sub>2</sub> por 10 minutos. As sementes foram, então, enxaguadas seis vezes

em água destilada autoclavada e introduzidas individualmente em tubos de ensaio, com 15 cm de altura e 2,5 de diâmetro, contendo 10 ml de meio de cultura.

O meio utilizado foi WPM sem reguladores, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,6% de ágar (Vetec®). O meio continha, ainda, 0,15% ou 0,2% de PPM™, mantendo-se um controle sem uso do produto. Os tubos de ensaio contendo meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 20 minutos, após ajuste do pH para 5,8.

Os tubos foram mantidos durante 60 dias em sala de crescimento e as taxas de contaminação fúngica e bacteriana, bem como a porcentagem de sementes germinadas, foram avaliadas após este período.

O delineamento experimental utilizado consistiu em um arranjo bifatorial, conforme o tempo e a solução utilizada antes da desinfestação (controle; 24h em água; 24h em 0,2% de PPM™; 48h em água ou 48h em PPM™) e a concentração de PPM™ no meio de cultura (0; 0,15% ou 0,2%). Para cada tratamento, foram feitas seis repetições consistindo em cinco sementes cada.

## 2.3 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

### 2.3.1 Giberelina na germinação *in vitro* de sementes de guanandi

Sementes ficaram imersas em água ou soluções de ácido giberélico (2,89; 5,77; 14,43 ou 28,89 µM), durante 24 ou 48 horas. Após a retirada da solução, as sementes foram lavadas com água corrente e detergente durante cinco minutos e seguiram para a desinfestação em câmara de fluxo laminar, em que foram utilizados etanol 70% (1 min), NaOCl 5% com 0,01% de Tween 20® (10 min) e HgCl<sub>2</sub> 0,1% (10 min). As sementes foram lavadas seis vezes em água destilada autoclavada e inseridas, individualmente, em tubos de ensaio contendo meio WPM.

O meio de cultura WPM, sem reguladores e acrescido de 0,6% de ágar (Vetec®) e 0,1% de PPM™, não continha sacarose e teve seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Os tubos foram mantidos em germinadora durante 90 dias, em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas. A germinação das sementes foi avaliada em

intervalos de dois dias durante este período e os dados obtidos foram utilizados para cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG).

O delineamento experimental foi bifatorial, conforme a concentração de GA<sub>3</sub> (0; 2,89; 5,77; 14,43 ou 28,89 µM) e o tempo de imersão na solução (24 ou 48 h). Para cada tratamento, foram utilizadas cinco repetições, contendo oito sementes cada, totalizando 40 sementes por tratamento. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de contaminação fúngica e/ou bacteriana, porcentagem de germinação, IVG e tempo para emergência de parte aérea. O IVG foi calculado seguindo-se a equação proposta por Maguire (1962).

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

Em que:

- t<sub>i</sub>: tempo entre o início do experimento e a i-ésima observação (em dias);
- n<sub>i</sub>: número de sementes que germinam no tempo t<sub>i</sub>;
- k: último dia da observação.

## 2.4 MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES

As brotações com mais de 2 nós, livres de contaminação fúngica ou bacteriana, foram cortadas e cada segmento nodal foi transferido para frasco contendo meio WPM acrescido de 8,8 µM de 6-benzilaminopurina (BAP). O restante do explante, incluindo a semente com ou sem raiz e parte da parte aérea, foi colocado em novo meio WPM sem reguladores, onde foi mantido até que aparecessem novas brotações que pudessem ser cortadas para repetir o processo. Para cada planta, foram feitas até três retiradas de segmentos nodais, com intervalo mínimo de 30 dias entre uma e outra.

O meio utilizado para multiplicação foi o WPM, contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,6% de ágar (Vetec®), 0,1% de PPM™ e 0,1% de PVP, além de 8,8 µM de BAP. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N, sendo autoclavado a

121°C durante 20 minutos. Foram colocados dois explantes em cada frasco de vidro, fechado com tampa de polipropileno, contendo 40 ml de meio de cultura cada.

Os explantes foram subcultivados a cada 30 dias, sendo transferidos para meio de cultura fresco. As extremidades necrosadas foram excisadas e descartadas e as brotações com mais de 3 cm foram individualizadas a cada mês. A etapa de multiplicação teve uma duração de seis meses, sendo avaliado o número de brotações por explante a cada mês durante este período.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett e, posteriormente, foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida pela comparação de médias a partir do Teste de Tukey a 5% de probabilidade. O software estatístico utilizado para as análises foi o Assistat 7.6.

## 2.6 CONDIÇÕES DE CULTURA

A germinação das sementes foi realizada em germinadora a 25°C, sob fotoperíodo de dias longos (16h). Durante a multiplicação, os explantes excisados das sementes foram mantidos em sala de crescimento a 20°C de noite e  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  de dia, sob fotoperíodo de 16h, sob luz branca fluorescente com DFFF (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) de aproximadamente  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES E GERMINAÇÃO *IN VITRO*

##### 3.1.1 Permanência em água e desinfestação com hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio

Ao final de 30 dias de cultura, a contaminação média das sementes para todos os tratamentos foi de 23% por fungos e 24% por bactérias. A análise estatística (ANEXO 2) indicou que a permanência em água não afetou as taxas de contaminação por fungos ou a sobrevivência das sementes (TABELA 1), nem a contaminação por bactérias (TABELA 3), apesar da contaminação bacteriana ter sido afetada pelo tempo de permanência em água.

TABELA 1 – EFEITO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA EM ÁGUA NA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E SOBREVIVÊNCIA EM SEMENTES DE *Calophyllum brasiliense* 30 DIAS APÓS DESINFESTAÇÃO COM HIPOCLORITO DE SÓDIO E CLORETO DE MERCÚRIO E INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA WPM SEM REGULADORES

TEMPO DE PERMANÊNCIA EM ÁGUA	% CONTAMINAÇÃO FÚNGICA	% DE SEMENTES NÃO CONTAMINADAS
0 (controle)	21,3 <sup>ns</sup>	60,0 <sup>ns</sup>
24 horas	24,7 <sup>ns</sup>	50,6 <sup>ns</sup>
48 horas	23,3 <sup>ns</sup>	47,3 <sup>ns</sup>
Média	23%	52,7%
CV	74,33%	40,33%

Foi aplicado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup>. Não significativo

Em relação ao uso de cloreto de mercúrio durante a desinfestação (ANEXO 3), a porcentagem de sementes não contaminadas foi maior no tratamento em que as sementes foram expostas por 8 minutos ao HgCl<sub>2</sub> (TABELA 2). A concentração do agente desinfestante, entretanto, não influenciou as taxas de contaminação fúngica ou sobrevivência.

TABELA 2 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E SEMENTES DE *Calophyllum brasiliense* NÃO CONTAMINADAS, EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO A CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl<sub>2</sub>) DURANTE A DESINFESTAÇÃO, 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO WPM SEM REGULADORES

CONCENTRAÇÃO DE HgCl <sub>2</sub>	% CONTAMINAÇÃO FÚNGICA			% DE SEMENTES NÃO CONTAMINADAS		
	4 min	8 min	Média	4 min	8 min	Média
0	-	-	22,2 <sup>ns</sup>	-	-	55,6 <sup>ns</sup>
0,1 %	22,2	18,9	20,6 <sup>ns</sup>	46,7	61,1	53,9 <sup>ns</sup>
0,2 %	32,2	20,0	26,1 <sup>ns</sup>	48,9	57,8	53,3 <sup>ns</sup>
Média	27,2 <sup>ns</sup>	19,4 <sup>ns</sup>	23,1	47,8 b	59,4 a	54,0
CV	73,18%			42,19%		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup>. Não significativo

Para a contaminação bacteriana, a análise estatística indicou interação entre os fatores testados (TABELA 3), sendo que, para maior tempo de permanência em água, torna-se necessária uma desinfestação mais forte (0,2% de HgCl<sub>2</sub> por 8 minutos, para 48 horas). De uma maneira geral, o tratamento com 0,2% de cloreto de mercúrio foi mais eficiente, sendo que a permanência prolongada das sementes em água resultou em maior contaminação bacteriana.

TABELA 3 – PORCENTAGEM DE SEMENTES CONTAMINADAS POR BACTÉRIAS, CONFORME TEMPO DE PERMANÊNCIA EM ÁGUA E TRATAMENTOS COM CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl<sub>2</sub>) NA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM SEMENTES DE *Calophyllum brasiliense* 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA WPM SEM REGULADORES

CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO A HgCl <sub>2</sub>	% CONTAMINAÇÃO DE SEMENTES POR BACTÉRIAS		
	0	24 h em água	48 h em água
0	10,0 aB	33,3 abAB	43,3 aA
0,1 % 4 min	30,0 aA	26,7 abA	36,7 abA
0,1 % 8 min	16,7 aA	13,3 abA	30,0 abA
0,2 % 4 min	23,3 aA	10,0 bA	23,3 abA
0,2 % 8 min	13,3 aB	40,0 aA	13,3 bB
Média	18,7%	24,7%	29,3%
CV	70,60%		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na mesma coluna, e letra maiúscula, na mesma linha, não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Mesmo que a análise estatística não tenha resultado em diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), a sobrevivência, considerando-se as sementes que permaneceram viáveis e sem contaminação após o período de 60 dias, foi maior no tratamento controle (TABELA 1), o que indica que a contaminação total aumenta na medida em que as sementes ficam imersas e que o tempo de imersão danifica as mesmas. Resultados semelhantes aos do presente trabalho foram obtidos para *Calophyllum inophyllum* (THENGANE *et al.* 2006), *Cordia trichotoma* (FICK *et al.*, 2007) e *Pinus taeda* (GOLLE *et al.*, 2010), indicando que o tempo de permanência de sementes em água favorece o aparecimento de contaminantes. Para Bewley *et al.* (2013), conforme a semente absorve água, as membranas celulares perdem a capacidade de retenção e ocorre a liberação de solutos, como açúcares, ácidos orgânicos, íons e proteínas. Estes, por sua vez, podem estimular o crescimento de fungos e bactérias, que podem invadir a semente.

O uso de cloreto de mercúrio faz-se necessário para sementes de guanandi, devido à alta contaminação das culturas (chegando a quase 50%), especialmente por bactérias, que podem ser combatidas com sua incorporação durante a desinfestação. O mercúrio, assim como outros metais pesados, inativa as proteínas celulares combinando-se com enzimas que contêm grupos sulfidrilas (-SH), inibindo o crescimento de microrganismos, mas com ação extremamente tóxica (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1997). O efeito deletério do  $HgCl_2$  em plantas já foi confirmado, porém não se conhece exatamente seus efeitos adversos em plantas cultivadas *in vitro* (MNG'OMBA *et al.*, 2011).

A taxa média de germinação *in vitro* foi de 12%, não havendo interferência dos tratamentos realizados (dados não mostrados). A germinação foi considerada muito baixa, sendo que apenas uma das sementes emitiu plúmula e desenvolveu parte aérea, mesmo após 120 dias de cultura.

A anormalidade das sementes, emitindo apenas raízes, pode ser explicada pelo excesso de solutos no meio de cultura, assim como aconteceu no caso do milho (MARTINELLI-SENEME, 2000). A presença de sacarose no meio de cultura pode ter reduzido seu potencial hídrico, resultando em baixa absorção de água por parte das sementes, prejudicando a germinação à medida que o embrião sofre estresse hídrico (BRADFORD, 1994). Segundo Bewley *et al.* (2013), se a captação de água for lenta demais, a germinação é reduzida devido à deterioração das sementes.

### 3.1.2 Adição de Cercobin® ao meio de cultura

Na cultura de sementes de guanandi, a contaminação média das sementes em meio contendo Cercobin® foi de 42% após 30 dias, sendo apenas 6,4% por fungos, demonstrando que o produto foi eficiente na redução deste tipo de contaminação dos explantes (TABELA 4). O tratamento em água por 48h aumentou significativamente a contaminação fúngica (ANEXO 4).

A contaminação bacteriana, porém, não foi afetada pelo tempo em água, mas aumentou em relação ao experimento anterior (36% em comparação com 24%). Esse aumento sugere que ocorre competição por recursos entre fungos e bactérias e, na ausência ou diminuição da população fúngica, as bactérias tendem a se multiplicar mais facilmente no meio de cultura.

TABELA 4 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E BACTERIANA E DE SEMENTES NÃO CONTAMINADAS DE *Calophyllum brasiliense* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA EM ÁGUA ANTES DA DESINFESTAÇÃO COM ETANOL, HIPOCLORITO DE SÓDIO E CLORETO DE MERCÚRIO, 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO WPM CONTENDO 0,5 g.L<sup>-1</sup> DE CERCOBIN®

TEMPO DE PERMANÊNCIA EM ÁGUA	% CONTAMINAÇÃO FÚNGICA	% CONTAMINAÇÃO BACTERIANA	% DE SEMENTES NÃO CONTAMINADAS
0 (controle)	3,3 a	32,7 <sup>ns</sup>	64,0 <sup>ns</sup>
24 horas	3,3 a	40,7 <sup>ns</sup>	56,0 <sup>ns</sup>
48 horas	12,7 b	34,7 <sup>ns</sup>	52,7 <sup>ns</sup>
Média	6,4%	36,0%	57,5%
CV	174,95%	65,11%	39,82%

Médias seguidas pela mesma letra para uma mesma variável não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup>. Não significativo

A permanência das sementes em água influenciou a contaminação por fungos, indicando novamente que a permanência das mesmas em água favorece a proliferação de microrganismos, por meio da liberação de açúcares que ocorre durante a embebição das mesmas (BEWLEY *et al.*, 2013). É indicado, portanto, que o tempo de imersão das sementes não ultrapasse o período de 24 horas, para evitar o aumento na contaminação das culturas.

Conforme Mng'omba *et al.* (2011), fungos que contaminam as culturas aumentam a mortalidade das plantas à medida que competem pelos mesmos

recursos (nutrientes e oxigênio) no meio de cultura ou produzem fitotoxinas. O uso de fungicidas sistêmicos pode ser uma alternativa no caso de contaminação endógena.

O Cercobin® é um fungicida sistêmico e, adicionado ao meio de cultura, é transportado até atingir todo o explante. Seu composto ativo é o metil tiofanato, que atua combatendo a contaminação fúngica devido à reconhecida propriedade de seu grupo, os benzimidazóis, de impedir a polimerização da tubulina durante a metáfase, consequentemente causando a inibição de divisões mitóticas e proliferação celular (GARCÍA-CELA *et al.*, 2012).

TABELA 5 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA EM SEMENTES DE *Calophyllum brasiliense* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO A CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl<sub>2</sub>) DURANTE A DESINFESTAÇÃO, 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO WPM CONTENDO 0,5 g.L<sup>-1</sup> DE CERCOBIN®

CONCENTRAÇÃO DE HgCl <sub>2</sub>	% CONTAMINAÇÃO FÚNGICA			% CONTAMINAÇÃO BACTERIANA			% DE SOBREVIVÊNCIA		
	4 min	8 min	Média	4 min	8 min	Média	4 min	8 min	Média
0	-	-	7,8 <sup>ns</sup>	-	-	51,1 a	-	-	41,1 b
0,1 %	7,8	5,6	6,7 <sup>ns</sup>	41,1	27,8	34,4 b	51,1	66,7	58,9 a
0,2 %	5,6	5,6	5,6 <sup>ns</sup>	36,7	23,3	30,0 b	57,8	71,1	64,4 a
Média	6,7 <sup>ns</sup>	5,6 <sup>ns</sup>	6,4	38,9 a	25,5 b	36,0	54,4 a	68,9 b	57,6
CV	182,48%			64,53%			40,17%		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para a mesma variável, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup>. Não significativo

Nos tratamentos com cloreto de mercúrio durante a desinfestação, não houve diferença significativa na contaminação bacteriana e sobrevivência entre as duas concentrações testadas, apenas em relação ao tratamento controle (TABELA 5; ANEXO 5). O fato indica que a utilização de HgCl<sub>2</sub> é necessária, mas que a concentração utilizada não influencia seu efeito. A contaminação fúngica foi baixa e a incorporação do desinfestante não reduziu o número de culturas atingidas.

Quanto maior o tempo de exposição ao cloreto de mercúrio durante a desinfestação, menor a contaminação bacteriana. A análise estatística também revelou que a diferença entre os resultados obtidos nos dois tempos de exposição

ao  $\text{HgCl}_2$  foi altamente significativa para a variável sobrevivência das culturas, apesar de não haver diferenças no caso da contaminação fúngica.

A taxa de germinação média das sementes utilizadas no experimento foi de pouco mais de 16%, não sendo afetada pelo tratamento de desinfestação ou imersão utilizados (dados não mostrados). Apenas duas sementes desenvolveram parte aérea, sendo que as demais apenas emitiram raízes, indicando desenvolvimento anormal das plântulas. Assim como no experimento anterior, esse fenômeno pode ser atribuído à presença de sacarose ou ao excesso de sais no meio de cultura.

### 3.1.3 Efeito do tratamento das sementes com PPM<sup>TM</sup> e imersão em água na contaminação e germinação.

Após 30 dias de cultura, a taxa média de contaminação das sementes de guanandi foi de 27%, sendo que os diferentes tratamentos afetaram as taxas de contaminação por fungos e/ou bactérias (ANEXO 6). O tratamento por 48h em 0,2% de PPM<sup>TM</sup> reduziu significativamente a contaminação fúngica e aumentou a sobrevivência. (TABELA 6).

O uso de PPM<sup>TM</sup> no meio de cultura também reduziu a contaminação, provando-se eficiente no combate aos microrganismos, especialmente fungos ( $p < 0,05$ ). Combinando-se o tratamento com 48h de imersão em PPM<sup>TM</sup> e meio contendo 0,2% do produto, a sobrevivência foi de 93,3%.

A contaminação bacteriana foi muito baixa, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos. O número de sementes não contaminadas aumentou conforme o aumento na concentração de PPM<sup>TM</sup> no meio de cultura, e também foi afetada pela solução na qual as sementes ficaram embebidas.

A combinação de fungicidas e antibióticos para eliminar tanto fungos quanto bactérias do meio de cultura deve ser evitada, pois costuma ser ineficiente e até fitotóxica (LEIFERT *et al.*, 1991). Assim, o uso do PPM<sup>TM</sup> como desinfestante, além de se provar eficiente, pode ser recomendado para que se evite a adição de antibióticos ao meio de cultura, já que estes devem ser específicos para o tipo de bactéria encontrada, exigindo sua identificação, além de apresentarem custo elevado.

Apesar da taxa de germinação alcançar quase 35%, superando os resultados dos experimentos anteriores, a emissão de plúmula ainda foi baixa e ocorreu em menos de 1% das sementes (FIGURA 1), mesmo 120 dias após a introdução *in vitro*. O fato indica, novamente, que algum aspecto da cultura não é favorável para o desenvolvimento das sementes de guanandi.

TABELA 6 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E BACTERIANA E DE SEMENTE NÃO CONTAMINADAS DE *Calophyllum brasiliense*, SUBMETIDAS A TRATAMENTOS COM PPM™ DURANTE A IMERSÃO PRÉVIA E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PPM™ ADICIONADO AO MEIO DE CULTURA, 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO EM MEIO WPM SEM REGULADORES.

TRATAMENTO	% CONTAMINAÇÃO FÚNGICA				% CONTAMINAÇÃO BACTERIANA				% DE SEMENTES NÃO CONTAMINADAS			
	0	0,15% PPM	0,20% PPM	Média	0	0,15% PPM	0,20% PPM	Média	0	0,15% PPM	0,20% PPM	Média
(controle)	46,7	33,3	26,7	35,6 a	0,0	0,0	0,0	0,0 <sup>ns</sup>	53,3	66,7	73,3	64,4 b
24h água	30,0	10,0	16,7	18,9 ab	6,7	3,3	6,7	5,6 <sup>ns</sup>	63,3	86,7	76,7	75,6 ab
24h PPM™	36,7	20,0	23,3	26,7 ab	3,3	3,3	3,3	3,3 <sup>ns</sup>	60,0	76,7	73,3	70,0 ab
48h água	33,3	33,3	23,3	30,0 ab	16,7	0,0	0,0	5,6 <sup>ns</sup>	50,0	66,7	76,7	64,4 b
48h PPM™	20,0	13,3	6,7	13,3 b	0,0	0,0	0,0	0,0 <sup>ns</sup>	80,0	86,7	93,3	86,7 a
Média	33,3 a	22,0 ab	19,3 b	24,89	5,3 <sup>ns</sup>	1,3 <sup>ns</sup>	2,0 <sup>ns</sup>	2,9	61,3 b	76,7 a	78,7 a	72,2
CV	75,19%				286,36%				25,48%			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A concentração de 0,2% de PPM™ foi utilizada nas soluções para permanência das sementes.

<sup>ns</sup>. Não significativo

## 3.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

### 3.2.1 Giberelina na germinação *in vitro* de sementes de guanandi

Para a porcentagem de germinação (TABELA 7), a exposição das sementes à água e algumas concentrações de GA<sub>3</sub> por 48 h foi prejudicial ( $p < 0,01$ ), reduzindo a taxa de germinação média para 60%, se comparado a 72% por 24 horas. O tempo de exposição ao GA<sub>3</sub> também afetou negativamente o aparecimento da plúmula ( $p < 0,05$ ). A maior concentração de giberelina (28,89  $\mu\text{M}$ ) reduziu a taxa de sementes germinadas ( $p < 0,05$ ), enquanto as porcentagens de germinação dos tratamentos com 5,77 ou 14,47  $\mu\text{M}$  não diferiram estatisticamente da taxa do controle, mas apresentaram bons resultados (ANEXO 7).

O aparecimento da plúmula deu-se a partir de 6 dias com o uso de GA<sub>3</sub> (dados não mostrados), entretanto não foi observada radícula para várias plantas nos tratamentos com GA<sub>3</sub>, mesmo 90 dias após a introdução *in vitro*, sugerindo algum tipo de inibição da emissão ou alongamento da radícula causada pelo aumento na concentração do regulador (FIGURA 1).

O IVG foi reduzido conforme o tempo de permanência em solução de giberelina aumentou, sendo que o tratamento a 28,89  $\mu\text{M}$  apresentou diferença estatística em relação aos outros tratamentos. Para esta concentração, houve inibição da protrusão radicular e surgimento da plúmula, indicando que esse regulador acarreta efeitos fitotóxicos em casos de exposição prolongada das sementes, assim como foi observado em culturas de *Capparis ovata* (SOYLER e KHAWAR, 2007) e *Capparis spinosa* (AREFI, NEJAD e KAFI, 2012).

A maior concentração de GA<sub>3</sub> utilizada (28,89  $\mu\text{M}$ ) inibiu tanto a protrusão da radícula quanto o aparecimento de plúmula e, portanto, foi pouco eficiente na germinação das sementes, além de reduzir significativamente a porcentagem de germinação. O efeito fitotóxico do regulador também foi mostrado para sementes de *Securidaca longipedunculata*, na medida em que as maiores concentrações resultaram em menor germinação (ZULU *et al.*, 2011). Para *Cicer arietinum*, a concentração ótima de giberelina para a germinação foi de 6  $\mu\text{M}$  e, acima disso, a porcentagem de germinação foi reduzida (KAUR, GUPTA e KAUR, 1998).

A taxa de germinação média das sementes foi de 65%, sem efeito dos tratamentos com ácido giberélico sobre essa porcentagem. Esse valor é muito superior à taxa dos experimentos anteriores e se equipara às taxas de germinação da espécie em seu ambiente natural (MARQUES e JOLY, 2000b; SOUZA e LORENZI, 2008).

TABELA 7 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG), IVG PARA EMERGÊNCIA DA PLÚMULA E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Calophyllum brasiliense* EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO GIBERÉLICO (GA<sub>3</sub>) OU MANTIDAS EM ÁGUA POR 24 OU 48 HORAS, ANTES DE INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO WPM

CONCENTRAÇÃO DE GA <sub>3</sub> (µM)	IVG (até 60 d)		% DE GERMINAÇÃO APÓS 60 DIAS		IVG (emergência da plúmula)		
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	Média
0	0,217 aA	0,160 aA	77,5 aA	57,5 abB	0,265	0,184	0,224 ab
2,89	0,084 bcA	0,153 aA	75,0 aA	42,5 bB	0,248	0,184	0,216 ab
5,77	0,167 abA	0,069 abB	77,5 aA	70,0 aA	0,283	0,258	0,270 a
14,47	0,150 abA	0,069 abB	80,0 aA	67,5 aA	0,294	0,244	0,269 a
28,89	0,027 cA	0,011 bA	50,0 bA	62,5 abA	0,183	0,167	0,175 b
Média	0,129	0,092	72%	60%	0,254 a	0,207 b	0,231
CV	52,23%		20,22%		28,98%		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na mesma coluna, e maiúscula na linha, não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes aos do presente trabalho foram obtidos com sementes de *Capparis spinosa*, quando a permanência em água por 48 horas causou efeitos danosos às sementes, impedindo sua germinação independentemente da concentração de GA<sub>3</sub> testada (AREFI, NEJAD e KAFI, 2012). Com o aumento da respiração causado por giberelinas, é provável que a imersão em água faça com que a disponibilidade de oxigênio seja reduzida até o ponto em que as sementes sofram danos irreparáveis e percam a capacidade de germinar. O excesso de água em condições anaeróbias é prejudicial à semente e, sob condições de anoxia, as sementes acumulam etanol e ácido láctico produzido durante a fermentação (POPINIGIS, 1985; BEWLEY *et al.*, 2013).

A ação das giberelinas durante o desenvolvimento dos embriões está ligada ao aumento da captação de oxigênio pelas sementes e estímulo da produção de enzimas hidrolíticas que, degradando a camada de aleurona presente nas sementes, liberam açúcares e peptídeos que permitem a germinação (PALEG, 1960;



BRIGGS, 1963; POPINIGIS, 1985). O  $GA_3$ , porém, tende a inibir a formação de raízes (BRIAN, HEMMING e LOWE, 1960; MOSHKOV *et al.*, 2006).

A sacarose, ausente no meio de cultura utilizado, mas presente nos experimentos anteriores, pode intervir nas taxas de germinação. Esse composto reduz o potencial hídrico do meio de cultura, dificultando a embebição e consequente germinação das sementes (POPINIGIS, 1985). Em cultura de *Hancornia speciosa*, as maiores taxas de germinação foram obtidas em meio de cultura sem sacarose ou com até  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  (PINHEIRO *et al.*, 2001). Para *Cereus jamacaru*, a concentração de apenas  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  no meio foi mais eficiente do que concentrações maiores para a germinação (RÊGO *et al.*, 2009).

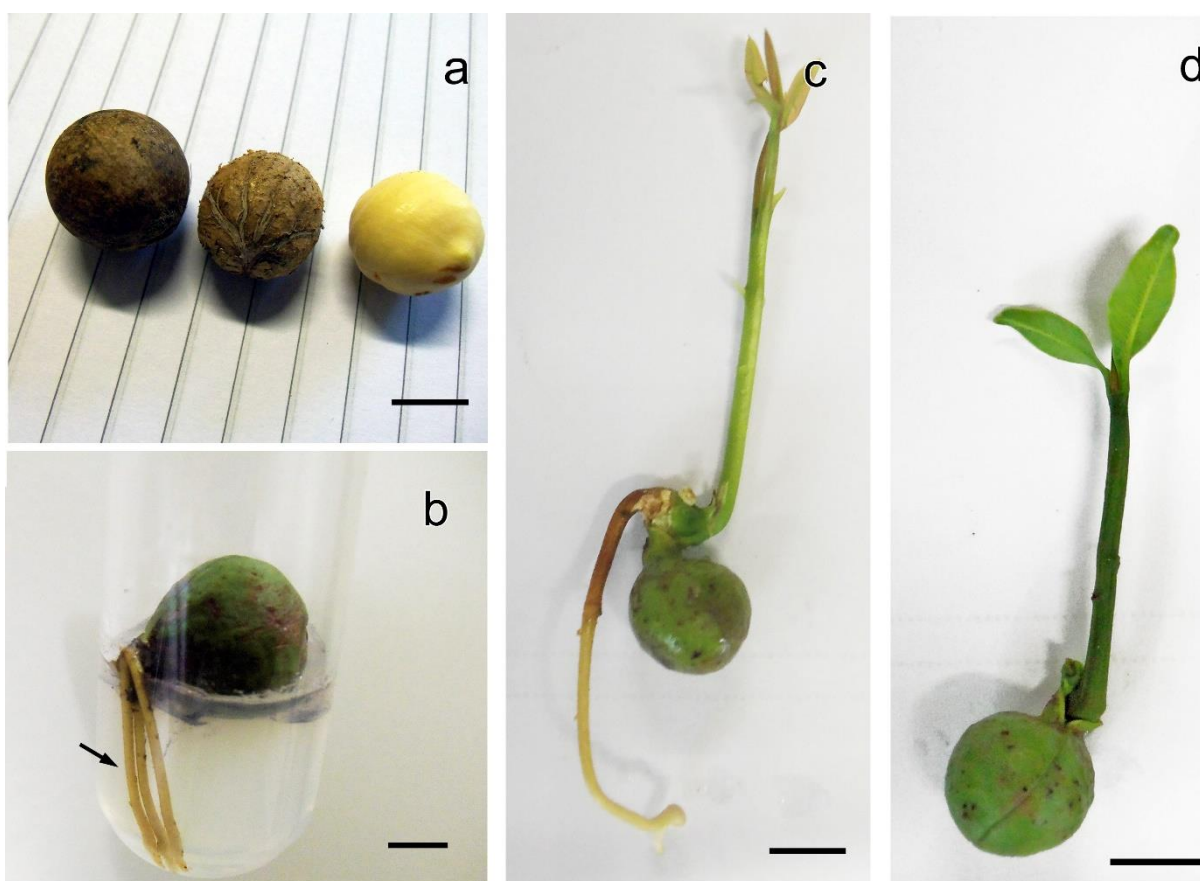


FIGURA 1 – SEMENTES DE *Calophyllum brasiliense* 90 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*; RESPECTIVAMENTE, COM ENDOCARPO; SEM ENDOCARPO E COM TEGUMENTO; SEM TEGUMENTO (CONFORME INTRODUZIDAS *IN VITRO*) (a); SEMENTE GERMINADA EM MEIO WPM COM  $30 \text{ g.L}^{-1}$  DE SACAROSE, FORMANDO APENAS RAÍZES (b); EM MEIO SEM SACAROSE, SEM APLICAÇÃO DE  $GA_3$  (c); EM MEIO WPM SEM SACAROSE, COM APLICAÇÃO DE  $5,77 \mu\text{M}$  DE  $GA_3$ , EVIDENCIANDO O NÃO APARECIMENTO DA RAIZ (d). BARRA: 1 CM. FONTE: o autor (2013)

### 3.4 MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES

Após 30 dias em meio de cultura WPM contendo 8,8  $\mu$ M de BAP, o número médio de brotações por explante foi 2, com desenvolvimento mais lento das brotações se comparadas às originadas de plantas mantidas em casa de vegetação. Após 60 e 90 dias, o número médio de brotações é de 2,7 e 3,4, respectivamente.

As sementes mantidas em meio de cultura, das quais eram seccionados os segmentos nodais, rebrotaram rapidamente e novas brotações podiam ser individualizadas em intervalos de 2 semanas a 1 mês. De uma mesma semente germinada, foram retirados segmentos nodais até 3 vezes, sem perda de capacidade de rebrote. Em seguida, as sementes foram transferidas para substrato contendo Plantmax® e vermiculita, na proporção de 1:1, em casa de vegetação, mantidas a 24°C e irrigadas por 5 min a cada 6 horas, com aproximadamente 90% de sobrevivência.

#### 4 CONCLUSÕES

A germinação *in vitro* de sementes de guanandi é possível, juntamente com a multiplicação dos segmentos nodais obtidos das plantas crescidas *in vitro*. É recomendado manter as sementes imersas em solução a 0,2% de PPM™ por 24 horas e, em seguida, desinfestá-las utilizando 0,2% de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), por 8 minutos. Indica-se o uso de meio WPM para a introdução das sementes, sem reguladores nem sacarose, com adição de 0,15% de PPM™.

O uso de ácido giberélico acelera a emissão da parte aérea até a concentração de 14  $\mu\text{M}$ , porém, acima dessa concentração, passa a inibi-la. Quanto maior a concentração de  $\text{GA}_3$  utilizada, menor o número de plantas que emitem raízes nessa fase. Assim, o  $\text{GA}_3$  pode ser adicionado em maior concentração se o objetivo do estudo for obter apenas a parte aérea das plantas.

## REFERÊNCIAS

- AREFI, I. H.; NEJAD, S. K.; KAFI, M. Roles of duration and concentration of priming agents on dormancy breaking and germination of caper (*Capparis spinosa* L.) for the protection of arid degraded areas. **Pakistan Journal of Botany**, v.44, p.225-230, 2012.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Springer, 2013.
- BRADFORD, K. J. Water stress and the water relations of seed development: a critical review. **Crop Science**, v.34, n.1, p.1-11, 1994.
- BRIGGS, D. E. Biochemistry of barley germination action of gibberellic acid on barley endosperm. **Journal of the Institute of Brewing**, v.69, 1963.
- BRIAN, P. W.; HEMMING, H. G.; LOWE, D. Inhibition of rooting of cuttings by gibberellic acid. **Annals of Botany**, v.24, n.96, 1960.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Vol. 1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.
- FARIA, M. B. B. C. **Diversidade e regeneração natural de árvores em florestas de restinga na Ilha do Cardoso, Cananéia, SP, Brasil**. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ecologia) – Departamento de Ecologia Geral, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- FICK, T. A.; BISOGNIN, D. A.; DE QUADROS, K. M.; HORBACH, M.; REINIGER, L. R. S. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo. **Ciência Florestal**, v.17, n.4, p.343-349, 2007.
- FISCHER, E.; DOS SANTOS, F. A. M. Demography, phenology and sex of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) trees in the Atlantic forest. **Journal of Tropical Ecology**, v. 17, p.903-909, 2001.
- GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.
- GARCÍA-CELA, E.; GIL-SERNA, J.; MARÍN, S.; ACEVEDO, H.; PATIÑO, B.; RAMOS, A. J. Effect of preharvest anti-fungal compounds on *Aspergillus steynii* and *A. carbonarius* under fluctuating and extreme environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.159, n.2, p.167-176, 2012.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; HANAUE, J. G.; WALDOW, D. A. G. Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, v.34, n.1, p.39-48, 2010.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; FILHO, V. C.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis*: structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v.65, p.267-272, 2002.

KAUR, S.; GUPTA, A. K.; KAUR, N. Gibberellic acid and kinetin partially reverse the effect of water stress on germination and seedling growth in chickpea. **Plant Growth Regulation**, v.25, p.29-33, 1998.

KING, R. Succession and micro-elevation effects on seedling establishment of *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) in an Amazonian river meander forest. **Biotropica**, v.35, n.4, p.462-471, 2003.

LEIFERT, C.; RITCHIE, J. Y.; WAITES, W. M. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.7, p.452-469, 1991.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation**, v.30, p.421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol 1. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

MARQUES, M. C. M.; JOLY, C. A. Estrutura e dinâmica de uma população de *Calophyllum brasiliense* Camb. em floresta higrófila do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.23, n.1, p.107-112, 2000a.

MARQUES, M. C. M.; JOLY, C. A. Germinação e crescimento de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma espécie típica de florestas inundadas. **Acta Botânica Brasílica**, Brasília, v.14, n.1, p.113-120, 2000b.

MARTINELLI-SENEME, A.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Germinação de milho cv.AL-34 em função do tamanho da semente e do potencial hídrico do substrato. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.2, p.131-138, 2000.

MNG'OMBA, S. A.; SILESHI, G.; du TOIT, E. S.; AKINNINFESI, F. K. Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures *In*: DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNERSELVAN, A. **Fungicides for plant and animal diseases**. InTech: Janeza Trdine, Croatia, 2011. p.245-254.

MOSHKOV, I. E.; NOVIKOVA, G. V.; HALL, M. A.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; Miscellaneous compounds. *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 227-282.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F.; CASTRO, E. M.; STEIN, V. C. Caracterização morfológica e química das sementes de *Calophyllum brasiliense* Cambess. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p. 144-146, 2007a.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F.; DOUSSEAU, S.; VIEIRA, C. V. Efeito da temperatura e do tegumento na germinação de sementes de *Calophyllum brasiliense*. **Ciência Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1872-1877, 2007b.

NEWSTROM, I. E.; FRANKIE, G. W. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical forest trees at La Selva, Costa Rica. **Biotropica**, v.26, p.141-159, 1994.

NOLDIN, V. F.; ISAÍAS, D. B.; FILHO, V. C. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Química Nova**, v.29, n.3, p.549-554, 2006.

PALEG, L. G. Physiological effects of gibberellic acid: I. on carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. **Plant Physiology**, v.35, n.3, p.293-299, 1960.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: Conceitos e aplicações, Vol. 1. Makron Books: São Paulo, 1997.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N.; MACÊDO, C. E. C.; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.413-416, 2001.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: Agiplan, 1985.

RÊGO, M. M.; ARAÚJO, R.; RÊGO, E. R.; CASTRO, J. P. *In vitro* seed germination of mandacaru (*Cereus jamacaru* DC.). **Revista Caatinga**, v.22, n.4, p.34-38, 2009.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture**: techniques and experiments. 2 ed, San Diego, CA: Academic Press, 2000.

SOUZA, M. C.; BESERRA, A. M. S.; MARTINS, D. C.; REAL, V. V.; DOS SANTOS, R. A. N.; RAO, V. S.; DA SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.452-458, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2ª ed. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2008.

SOYLER, D.; KHAWAR, K. M. Seed germination of caper (*Capparis ovate* var. *Herbacea*) using  $\alpha$  naphthalene acetic acid and gibberellic acid. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.9, n.1, 2007.

THENGANE, S. R.; BHOSLE, S. V.; DEODHAR, S. R.; PAWAR, K. D.; KULKARNI, D. K. Micropropagation of Indian laurel (*Calophyllum inophyllum*), a source of anti-HIV compounds. **Current Science**, v.90, n.10, p.1393-1397, 2006.

ZULU, D.; THOKOZANI, B. L. K.; SILESHI, G. W.; TEKLEHAIMANOT, Z.; GONDWE, D. S. B.; SARASAN, V.; STEVENSON, P. C. Propagation of the African medicinal and pesticidal plant, *Securidaca longepedunculata*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.32, p.5988-5992, 2011.

## CAPÍTULO 2

### MICROPROPAGAÇÃO DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* Cambess.) A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS

#### RESUMO

O guanandi é uma espécie lenhosa com grande potencial para utilização na indústria madeireira, reposição de mata ciliar e extração de metabólitos secundários para tratamento de várias doenças, incluindo o vírus da AIDS. A propagação sexuada é difícil devido à frutificação ser irregular e a alta predação das sementes. O armazenamento das mesmas não é possível, visto que são recalcitrantes. A cultura de tecidos surge como alternativa para a propagação de espécies com dificuldades de propagação em larga escala, como o guanandi. O objetivo do trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação da espécie a partir de segmentos nodais. Para a desinfestação de segmentos de plantas de casa de vegetação, foram testadas soluções de 0,1 ou 0,2% de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), durante 2 ou 4 min. O tempo de exposição de 4 min resultou em maior sobrevivência (81%) que o de 2 min (66%). Em um segundo experimento, *Plant Preservative Mixture* (PPM™) foi adicionado ao meio de cultura WPM nas concentrações de 0,2; 0,4 ou 0,8%. A sobrevivência foi de 56% no controle e 92% nos tratamentos com 0,4 e 0,8% de PPM. Antioxidantes foram também incorporados ao meio de cultura, sendo 1 g.L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP-40), 1 g.L<sup>-1</sup> de CA, 200 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, ácido cítrico ou ácido ascórbico, mantendo-se um tratamento controle. No meio com PVP-40, 15% dos explantes apresentaram oxidação enquanto que, no tratamento controle, foram 85%. Além disso, 35% das culturas controle apresentaram oxidação intensa, com difusão de compostos fenólicos para o meio de cultura, enquanto o uso de PVP-40 e ácido ascórbico eliminou completamente a oxidação intensa. Para a multiplicação, a 6-benzilaminopurina (BAP) foi utilizada, nas concentrações de 4,4; 8,8 ou 11 µM. Após 90 dias, foi obtida uma média de 4,4 a 4,8 brotações por explante nos tratamentos com BAP, sendo que a maior concentração testada resultou em alta taxa de necrose. O número médio de brotações por explante no tratamento controle foi de 2,03. Durante o alongamento, foram testados 1,1 ou 2,2 µM de BAP, assim como concentrações de até 11,15 µM de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ). Após 60 dias, nenhum dos reguladores ou concentrações promoveu o alongamento dos explantes, e o  $\text{GA}_3$  causou necrose dos mesmos. Durante o enraizamento, 10 ou 20 µM de ácido indolbutírico (AIB) ou ácido naftalenoacético (ANA) foram adicionados ao meio de cultura e os explantes permaneceram por 7 dias no escuro, sendo então transferidos para meio sem reguladores. Após 60 dias, 24% dos explantes tratados com 10 µM de ANA enraizaram. As plantas enraizadas foram transferidas para casa de vegetação e, após 30 dias, a sobrevivência foi de 78,9%. Em conclusão, esse trabalho mostra que a micropropagação do guanandi a partir de segmentos nodais é um procedimento viável.

Palavras-chave: AIB, ANA, antioxidantes, BAP,  $\text{GA}_3$ , meio WPM.



## CHAPTER 2

### MICROPROPAGATION OF GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* Cambess.) FROM NODAL SEGMENTS

#### ABSTRACT

*Calophyllum brasiliense* ("guanandi") is a woody species with high potential for use in the timber industry, recovery of riparian vegetation and extraction of secondary metabolites for the treatment of various diseases, including the HIV virus. Its sexual propagation is difficult due to irregular fruiting and high seed predation. Seed storage is impossible, since seeds are recalcitrant. Tissue culture is an alternative for the propagation of species with limited large scale production, such as guanandi. The aim of the present study was to develop a micropropagation protocol for nodal segments of this species. For surface sterilization of segments obtained from greenhouse plants, solutions of 0.1 or 0.2% mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) were tested for 2 or 4 min. Exposure time of 4 min resulted in higher survival rates (81%) than 2 min (66%). In a second experiment, Plant Preservative Mixture (PPM™) was added to the culture medium at concentrations of 0.2, 0.4 or 0.8%. The survival rate was 56% in control treatment and 92% in treatments with 0.4 or 0.8% of PPM™. Antioxidants were also added to the culture medium, being 1 g.L<sup>-1</sup> polyvinylpyrrolidone (PVP -40), 1 g.L<sup>-1</sup> activated charcoal, 200 mg.L<sup>-1</sup> cysteine, ascorbic acid or citric acid, keeping a control treatment without any antioxidant. On the medium containing PVP-40, 15% of explants presented oxidation, compared to the control treatment (85%). In addition, 35% of control cultures exhibited high oxidation, while the use of PVP-40 or ascorbic acid prevented high oxidation. For multiplication, 6- benzylaminopurine (BAP) was used at concentrations of 4.4, 8.8 or 11 µM. After 90 days, an average of 4.4 to 4.8 shoots per explant were obtained in treatments with BAP and the highest concentration resulted in high rate of necrosis. The average number of shoots per explant in the control treatment was 2.03. During elongation, 1.1 or 2.2 µM of BAP were tested, as well as concentrations of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) up to 11.15 µM. After 60 days, none of the concentrations tested promoted the elongation of the explants and GA<sub>3</sub> caused their necrosis. For rooting induction, 10 or 20 µM of indolbutyric acid (IBA) or naphthalene acetic acid (NAA) were added to the culture medium, the explants being maintained for 7 days in the dark, and then transferred to a medium without auxin. After 60 days, 24% of explants treated with 10 µM NAA rooted, compared to 8% of the shoots exposed to IBA, in both concentrations. The rooted plants were transferred to the greenhouse and, after 30 days, the survival was 78.9%. It was concluded that micropropagation of guanandi from nodal segments is a viable procedure.

Keywords: antioxidants, BAP, IBA, GA<sub>3</sub>, NAA, WPM medium.

## 1 INTRODUÇÃO

O guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess.) é uma espécie lenhosa, pertencente à família Clusiaceae, com grande potencial para utilização na indústria madeireira (FLORES, 2002), reposição de mata ciliar (NERY *et al.*, 2007) e extração de metabólitos secundários para tratamento de várias doenças, incluindo o vírus da AIDS (ITO *et al.*, 2002; NOLDIN *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2009; BREZZAN *et al.*, 2012).

A propagação em larga escala desta espécie é dificultada por sua frutificação irregular, ocorrendo em intervalos de até 41 meses (FISCHER e DOS SANTOS, 2001), aliados à alta predação das sementes, especialmente por pequenos mamíferos (KING, 2003). O armazenamento das sementes não é possível, visto que as mesmas são recalcitrantes (CARVALHO, 2006) e perdem a viabilidade em nove meses quando acondicionadas (NERY *et al.*, 2007). Além disso, não existe propagação vegetativa dessa espécie (SCARANO *et al.*, 2005),

A cultura de tecidos surge como alternativa para a propagação de espécies com dificuldades de produção em larga escala. A micropropagação, se comparada com métodos convencionais de propagação de plantas, tem muitas vantagens e sua aplicação na horticultura, agricultura e engenharia florestal está se expandindo ao redor do mundo (RATHORE, RATHORE e SHEKHAWAT, 2013).

Métodos de propagação vegetativa têm sido desenvolvidos há muitos séculos, mas estas técnicas utilizam porções relativamente grandes de plantas, enquanto a micropropagação tem a grande vantagem de necessitar apenas de um pequeno explante para que se inicie a cultura (GEORGE e DEBERGH, 2008). Além disso, o cultivo de plantas *in vitro* é realizado em um ambiente controlado, o que permite a clonagem de plantas economicamente importantes (ILIEV *et al.*, 2010).

Várias técnicas para micropropagação de plantas foram desenvolvidas, incluindo a indução de brotações axilares e adventícias, a cultura de meristemas isolados e a regeneração de plantas por organogênese e/ou embriogênese somática (ILIEV *et al.*, 2010).

Para George e Debergh (2008), culturas iniciadas a partir de segmentos nodais são baseadas na formação repetitiva de brotações novas, a partir de ramificações axilares. Nessa técnica, são produzidas inúmeras plantas a partir do

explante inicial e, por isso, este é o método de micropropagação mais amplamente utilizado (GEORGE e DEBERGH, 2008; ILIEV *et al.*, 2010).

Apesar das várias vantagens da cultura de tecidos, existem vários empecilhos relacionados a essa técnica, que deve ser adaptada para cada espécie em particular ou, em alguns casos, para cada genótipo. Dificuldades no estabelecimento de culturas assépticas, baixas taxas de explantes responsivos na multiplicação ou habituação às citocininas - levando à perda na capacidade de alongamento e enraizamento -, hiperidricidade e variação somaclonal são alguns dos fatores limitantes da técnica (ILIEV *et al.*, 2010). Além disso, a frequência de liberação de compostos fenólicos, levando à necrose do explante, o baixo enraizamento e dificuldades no transplante das plantas produzidas *in vitro* para o ambiente *ex vitro* são maiores em plantas lenhosas do que em herbáceas (GEORGE e DEBERGH, 2008).

A maioria das plantas necessita de elevados níveis de citocininas para promover a multiplicação de brotações múltiplas (GEORGE e DEBERGH, 2008). Para Van Staden, Zazimalova e George (2008), apesar da ocorrência de citocininas endógenas em plantas inteiras, muitos tecidos e órgãos pequenos isolados para a cultura *in vitro* são incapazes de sintetizar quantidades suficientes dessas substâncias. Dentre as citocininas sintéticas mais comumente utilizadas na micropropagação, destacam-se a cinetina e benzilaminopurina (BAP). Em protocolo de micropropagação desenvolvido para *C. apetalum* (NAIR e SEENI, 2003), utilizando 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina durante a multiplicação, os melhores resultados foram obtidos para segmentos nodais mantidos em meio de cultura com 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP.

Brotações são comumente tratadas com ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) para alongarem antes do enraizamento, em uma etapa de alongamento (MOSHKOV *et al.*, 2008). O alongamento também pode ser realizado mantendo-se as brotações em meio de cultura sem reguladores, assim como para *C. apetalum* (NAIR e SEENI, 2003).

A auxina natural mais comum em plantas é o ácido indol-3-acético (AIA), porém sua concentração pode não ser suficiente para a iniciação de raízes dos explantes e normalmente é necessária a adição de auxinas exógenas para promover as respostas rizogênicas das culturas (MACHAKOVA, ZAZIMALOVA e GEORGE, 2008). Apesar de ser usado na micropropagação, o AIA tende a ser oxidado pela luz

e rapidamente metabolizado pelo explante, portanto muitas vezes é preferível o uso de auxinas sintéticas mais estáveis, como o ácido indolbutírico (AIB) ou ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) (MACHAKOVA, ZAZIMALOVA e GEORGE, 2008). Para o enraizamento de *C. inophyllum*, foram testados AIA, ANA e AIB, com a concentração de 9,8  $\mu$ M de AIB resultando em maior taxa de enraizamento (56%).

O objetivo geral do presente estudo é desenvolver um protocolo para micropropagação de guanandi (*Calophyllum brasiliense*), utilizando como explantes iniciais segmentos nodais obtidos de plantas de casa de vegetação. Os objetivos específicos são:

- Estabelecer a cultura asséptica de segmentos nodais de guanandi, a partir de plantas de casa de vegetação;
- Determinar o melhor antioxidante para evitar oxidação fenólica dos explantes;
- Determinar a melhor concentração de BAP, a ser utilizada durante a multiplicação das brotações;
- Promover o alongamento das brotações, testando BAP e GA<sub>3</sub> durante esta etapa;
- Estabelecer a melhor auxina, entre AIB e ANA, e sua concentração para enraizamento dos explantes;
- Realizar o transplântio e aclimatização de mudas cultivadas *in vitro*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

O material utilizado consistiu em segmentos nodais com 2 cm de comprimento, obtidos a partir de plantas de um a dois anos de idade, mantidas em casa de vegetação anexa ao Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, ou fornecidas pela Embrapa-Florestas, em Colombo, PR. As plantas foram tratadas semanalmente com solução a 0,3% de Cercobin® e irrigadas manualmente a cada dois dias.

### 2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal, localizado no Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

#### 2.2.1 Desinfestação utilizando cloreto de mercúrio

Segmentos nodais e apicais foram excisados a partir de brotações obtidas da Embrapa-Florestas, em Colombo (PR) e utilizados como explantes. Os segmentos, ainda com o pecíolo e parte da base da folha, foram lavados com água corrente e detergente comercial por 5 minutos e enxaguados em água destilada. Em câmara de fluxo laminar, foram desinfestados em etanol 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) 5% durante 10 minutos, acrescido de 0,01% de agente surfactante Tween 20® e solução de 0,1 ou 0,2% de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), durante 2 ou 4 minutos, sob agitação durante todo o procedimento. Os segmentos foram, então, lavados seis vezes em água destilada autoclavada.

As extremidades dos explantes foram seccionadas para eliminar as porções oxidadas e o pecíolo foliar foi removido. A gema apical foi excisada, mantendo-se duas gemas axilares por explante. Os explantes foram introduzidos, individualmente e em posição vertical, em frascos de vidro medindo 5 cm de altura por 3 cm de diâmetro, contendo 10 ml de meio de cultura WPM (*“Woody plant medium”*, LLOYD e MCCOWN, 1980), fechados com papel alumínio. O meio de cultura foi acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,6% de ágar (Vetec®), previamente autoclavado a 121°C por 20 minutos. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

As porcentagens de contaminação fúngica e bacteriana e de sobrevivência foram avaliadas após 30 dias. O delineamento experimental utilizado foi um arranjo bifatorial, considerando a concentração de HgCl<sub>2</sub> (0,1 ou 0,2%) e o tempo de exposição à solução (2 ou 4 minutos). Foram utilizadas cinco repetições, contendo 10 explantes cada uma, em frascos individuais, totalizando 50 explantes por tratamento.

#### 2.2.2 Adição de PPM™ no meio de cultura

Segmentos nodais e apicais foram excisados a partir de brotações mantidas na casa de vegetação do Laboratório de Micropropagação da UFPR. Os segmentos foram lavados com água e detergente por cinco minutos e enxaguados em água destilada, ainda com o pecíolo e a base da folha. Em câmara de fluxo laminar, foram desinfestados em etanol 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sódio (NaOCl) 5% durante 10 minutos, acrescido de 0,01% de Tween 20®, sob agitação constante. Finalmente, os explantes foram lavados três vezes em água destilada autoclavada.

As extremidades dos explantes foram seccionadas para eliminar as partes oxidadas e as folhas foram removidas, mantendo-se os pecíolos. No caso de brotações apicais a gema apical foi removida. Os explantes com duas gemas axilares foram introduzidos, individualmente e em posição vertical, em tubos de ensaio medindo 15 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro, fechados com tampas de plástico e contendo 10 ml de meio de cultura WPM sem fitorreguladores.

O meio de cultura WPM foi acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,6% de ágar (Vetec®), 0,1% de polivinilpirrolidona (PVP-40) e concentrações de 0,2; 0,4 ou 0,8%

de *Plant Preservative Mixture* (PPM™), mantendo-se um controle sem o produto. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes de ser autoclavado a 121°C por 20 minutos.

A porcentagem de contaminação por fungos e bactérias e a sobrevivência foram avaliadas após 30 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, contendo cinco repetições, com 10 explantes cada uma, totalizando 50 explantes por tratamento.

### 2.2.3 Adição de antioxidantes e adsorventes ao meio de cultura WPM

Segmentos nodais e apicais com cerca de 2 cm de comprimento, obtidos a partir de brotações fornecidas pela Embrapa Florestas (Colombo, PR) foram lavados com água e detergente por 5 minutos e enxaguados em água destilada. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram desinfestados em etanol 70% (1 minuto), NaOCl 5% acrescido de 0,01% de Tween 20® (5 minutos) e HgCl<sub>2</sub> 0,1% (5 minutos), em agitação constante, sendo finalmente lavados seis vezes com água destilada autoclavada.

As extremidades oxidadas dos explantes foram cortadas, juntamente com a folha e as gemas apicais, e os explantes foram introduzidos individualmente, em posição vertical, em tubos de ensaio contendo meio WPM sem reguladores, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,6% de ágar (Vetec®). Para cada tratamento, um dos seguintes antioxidantes foi adicionado ao meio de cultura: 1 g.L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP-40), 1 g.L<sup>-1</sup> de CA, 200 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, ácido cítrico ou ácido ascórbico, mantendo-se o controle sem adição de nenhuma substância. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Após 30 dias de cultura, a oxidação da base dos explantes foi avaliada, além da oxidação intensa (quando os compostos fenólicos se difundiram para o meio de cultura). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), contendo cinco repetições, de oito explantes cada (um explante por tubo de ensaio), para cada tratamento. O experimento foi repetido uma vez.

### 2.3 MULTIPLICAÇÃO A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS E APICAIS

Os explantes, isentos de contaminação bacteriana ou fúngica (FIGURA 2a), obtidos a partir da fase de estabelecimento de culturas assépticas, foram transferidos do meio sem reguladores para frascos contendo meio com 6-benzilaminopurina (BAP) após 30 dias. As extremidades oxidadas dos explantes foram cortadas, mantendo-se o segmento nodal original.

O meio de cultura utilizado foi o WPM acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,6% de ágar (Vetec®) e 0,1% de PPM™, além de concentrações de 4,4; 8,8 ou 11 µM de BAP, mantendo-se um tratamento sem BAP como controle. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N, sendo autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Foram colocados dois explantes em cada frasco de vidro de 9 cm de altura por 6,5 cm de diâmetro, fechado com tampa de polipropileno, contendo 40 ml de meio de cultura cada.

Os explantes foram transferidos para meio de cultura com as mesmas concentrações de regulador a cada 30 dias, durante os 6 meses seguintes à introdução *in vitro*. Durante as repicagens, o explante inicial foi mantido, cortando-se apenas as extremidades oxidadas e as folhas maiores. Em testes preliminares, as brotações com menos de 2 cm que foram individualizadas sofreram necrose. Assim, somente brotações com mais de 3 cm foram individualizadas e subcultivadas, a cada 30 dias, sendo excisadas do explante original. O número de brotações foi avaliado a cada 30 dias, durante três meses.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), composto de cinco repetições, contendo 10 segmentos nodais (2 explantes por frasco), totalizando 50 explantes para cada concentração de BAP. O experimento foi repetido uma vez.



## 2.4 ALONGAMENTO

### 2.4.1 Uso de benzilaminopurina em meio WPM

Brotações menores de 2 cm, derivadas da etapa de multiplicação com BAP, onde permaneceram por 6 meses, foram utilizadas para o alongamento. As brotações não individualizadas, ou seja, ainda aderidas ao segmento nodal inicial, foram transferidas para meio de cultura WPM contendo BAP em concentrações mais baixas do que na etapa de multiplicação (1,1  $\mu\text{M}$  e 2,2  $\mu\text{M}$ ), além de um controle sem adição do regulador.

O meio de cultura utilizado foi o WPM acrescido de 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, 0,6% de ágar (Vetec®), 0,1% de PPM™ e 0,1% de PVP-40. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N, sendo autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Dois segmentos nodais foram colocados em cada frasco de vidro de 9 cm de altura por 6,5 cm de diâmetro, fechado com tampa de polipropileno, contendo 40 ml de meio de cultura.

O comprimento das brotações foi mensurado após 60 dias em meio de cultura, realizando-se um subcultivo para meio novo, idêntico, após o primeiro mês. A base oxidada de cada explante foi cortada durante a subcultura.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), contendo cinco repetições com seis explantes cada, totalizando 30 segmentos para cada um dos tratamentos.

### 2.4.2 Uso de ácido giberélico em meio WPM

Segmentos nodais com brotações menores de 2 cm, livres de contaminação microbiana e obtidas após a etapa de multiplicação com BAP, onde permaneceram por seis meses, foram utilizadas para o alongamento. As brotações foram transferidas para meio de cultura WPM contendo ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ), nas concentrações de 2,89  $\mu\text{M}$ , 5,77  $\mu\text{M}$  e 11,15  $\mu\text{M}$ , mantendo-se um controle sem adição do regulador.

O meio de cultura utilizado foi o WPM acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,6% de ágar (Vetec®), 0,1% de PPM™ e 0,1% de PVP-40. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N, sendo esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Após a autoclavagem, GA<sub>3</sub> esterilizado por filtração com filtro de 0,2 µm foi adicionado ao meio de cultura, em câmara de fluxo laminar. Os segmentos nodais foram colocados, dois a dois, em frascos de vidro com 9 cm de altura por 6,5 cm de diâmetro, fechados com tampa de polipropileno, contendo 40 ml de meio de cultura.

Após 30 dias, os explantes foram avaliados quanto ao comprimento das brotações e porcentagem de necrose. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), contendo cinco repetições compostas de cinco explantes cada, totalizando 25 segmentos para cada concentração de GA<sub>3</sub>.

## 2.5 ENRAIZAMENTO

Brotações maiores de 3 cm, obtidas após 6 meses em etapa de multiplicação em BAP, foram individualizadas e utilizadas para enraizamento. A base dos explantes foi cortada em bisel duplo e as brotações foram transferidas para meio WPM contendo 10 µM ou 20 µM de ácido indolbutírico (AIB) ou ácido naftalenoacético (ANA), onde permaneceram por 7 dias, no escuro.

O meio de cultura WPM foi acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,6% de ágar (Vetec®), 0,1% de PPM® e 0,1% de PVP-40, além de uma das duas auxinas. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N, sendo autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Os segmentos nodais foram introduzidos, dois a dois, em frascos de vidro de 9 cm de altura por 6,5 cm de diâmetro, fechados com tampa de polipropileno contendo 40 ml de meio de cultura.

Após 7 dias no escuro em meio com auxina, as brotações foram transferidas para meio WPM idêntico, porém sem adição de nenhum regulador vegetal. A avaliação de porcentagem de explantes enraizados e número de raízes por brotação foi realizada após 60 dias, havendo um subcultivo para meio idêntico, sem reguladores, após o primeiro mês.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), compondo-se de cinco repetições, contendo seis explantes cada, em um total de 30 brotações por tratamento.

## 2.6 ACLIMATIZAÇÃO

As plantas enraizadas foram aclimatizadas em bandejas, em uma mistura de Plantmax® e vermiculita, na proporção de 1:1. Elas foram mantidas a 24°C em casa de vegetação iluminada com lâmpadas de vapor de mercúrio, e irrigadas automaticamente por 5 min a cada 6 horas.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett para verificação de homogeneidade e então à análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. O software estatístico utilizado foi o Assistat 7.6.

## 2.8 CONDIÇÕES DE CULTURA

Em todas as etapas *in vitro*, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a  $19 \pm 2^\circ\text{C}$  de noite e  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  de dia, em condições de fotoperíodo de dias longos (16 h), sob luz branca fluorescente com DFFF (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) de aproximadamente  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

##### 3.1.1 Uso de cloreto de mercúrio na desinfestação de segmentos nodais

Explantos contaminados por fungos foram observados a partir de sete dias da introdução *in vitro*, enquanto as bactérias começaram a aparecer apenas após 14 dias. Ao final de 30 dias de cultivo, a sobrevivência média dos explantes foi de 73,5% (TABELA 1), com a contaminação fúngica atingindo menos de 10% das culturas. Segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade (ANEXO 8), o uso de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) não resultou em diferenças significativas entre as médias, indicando que a concentração de  $\text{HgCl}_2$  não tem influência nas taxas de contaminação ou sobrevivência dos explantes. Quando se considerou o tempo de exposição ao agente desinfestante, porém, as diferenças entre os resultados foram significativas ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ), indicando que quanto maior o tempo de exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , menor a taxa de contaminação bacteriana e maior a sobrevivência.

TABELA 1 – PORCENTAGEM DE SEGMENTOS NODAIS DE *Calophyllum brasiliense* CONTAMINADOS POR FUNGOS E BACTÉRIAS E SOBREVIVÊNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SOLUÇÃO DE CLORETO DE MERCÚRIO ( $\text{HgCl}_2$ ) E TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO AGENTE, 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO WPM SEM FITORREGULADORES.

CONCENTRAÇÃO DE $\text{HgCl}_2$	% CONTAMINAÇÃO FÚNGICA			% CONTAMINAÇÃO BACTERIANA			% DE SOBREVIVÊNCIA		
	2 min	4 min	Média	2 min	4 min	Média	2 min	4 min	Média
0,1 %	6,0	2,0	4,0 <sup>ns</sup>	26,0	10,0	18,0 <sup>ns</sup>	68,0	88,0	78,0 <sup>ns</sup>
0,2 %	4,0	6,0	5,0 <sup>ns</sup>	32,0	20,0	26,0 <sup>ns</sup>	64,0	74,0	69,0 <sup>ns</sup>
Média	5,0 <sup>ns</sup>	4,0 <sup>ns</sup>	4,5	29,0 a	15,0 b	22,0	66,0 a	81,0 b	73,5
CV	140,55%			48,21%			24,16%		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cada variável, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup>. Não significativo

A adição de cloreto de mercúrio durante a desinfestação é necessária, uma vez que testes preliminares apenas com hipoclorito de sódio (NaOCl) não se mostraram eficientes, com contaminação média acima de 40%. Além disso, concentrações elevadas de hipoclorito (7,5%) danificaram os tecidos, causando altas taxas de oxidação e necrose (>50%). Danos aos explantes, devido a altas concentrações de hipoclorito de sódio, também foram observados em segmentos nodais de *Allanblackia stuhlmannii* (NEONDO *et al.*, 2011), *Carya illinoensis* (AFTAB e PREECE, 2007) e pessegueiro (AHMAD *et al.*, 2003).

O cloreto de mercúrio também foi utilizado na desinfestação de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra*), sendo que uma concentração inferior a do presente trabalho (0,25%) reduziu a contaminação das culturas para menos de 10%. Entretanto, quando os explantes foram expostos a diferentes concentrações de NaOCl, apresentaram mortalidade de 100% e, além disso, o NaOCl não reduziu a contaminação dos explantes (SILVA *et al.*, 2010).

Segundo Mng'Omba *et al.* (2012), o  $\text{HgCl}_2$  é um desinfestante mais forte do que o NaOCl, sendo esta a razão provável para sua eficácia em combater até mesmo fungos endógenos. A mortalidade das culturas, porém, pode ser mais elevada devido aos danos celulares causados por desinfestantes considerados mais fortes, assim como foi no caso de *Calophyllum apetalum* (NAIR e SEENI, 2003). Entretanto, o uso de soluções como hipoclorito de sódio ou cálcio pode resultar no reaparecimento de contaminantes endógenos em qualquer estágio após a iniciação das culturas (MNG'OMBA *et al.*, 2012).

Depois deste experimento, padronizou-se o uso da concentração de 0,1% de  $\text{HgCl}_2$  na desinfestação dos explantes para evitar a toxicidade da solução, assim como o tempo de 4 a 5 minutos, que foi mais eficaz na redução da contaminação bacteriana sem causar maiores danos aos tecidos.

### 3.1.2 Adição de PPM™ no meio de cultura

Após 30 dias de cultura, a sobrevivência dos explantes foi maior no caso dos explantes que permaneceram em meio com PPM™, atingindo até 92% (TABELA 2). A análise estatística (ANEXO 9) revelou que o uso de PPM™, independente da concentração, é altamente efetivo no combate a bactérias, sendo que as

concentrações de 0,4% e 0,8% do produto as eliminaram completamente das culturas ( $p < 0,01$ ). Os tratamentos com PPM™ também resultaram em maior sobrevivência ( $p < 0,01$ ). A concentração de 0,8% reduziu drasticamente a contaminação fúngica quando comparada com o tratamento controle.

A taxa de necrose foi baixa em todos os tratamentos (média de 3,5%).

TABELA 2 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Calophyllum brasiliense* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PPM™ NO MEIO DE CULTURA WPM CONTENDO 0,1% DE PVP, 30 DIAS APÓS ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

CONCENTRAÇÃO DE PPM™ NO MEIO	% CONTAMINAÇÃO FÚNGICA	% CONTAMINAÇÃO BACTERIANA	% DE NECROSE	% DE SOBREVIVÊNCIA
0	18 a	20 a	4 <sup>ns</sup>	56 a
0,2%	6 ab	2 b	2 <sup>ns</sup>	90 b
0,4%	6 ab	0 b	2 <sup>ns</sup>	92 b
0,8%	2 b	0 b	6 <sup>ns</sup>	92 b
Média	8,5	5,5	3,5 <sup>ns</sup>	82,5
CV	88,39%	99,59%	142,86%	11,42%

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, para cada variável, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup>. Não significativo

Conforme indicação do fabricante, o PPM™ é efetivo na redução ou prevenção do crescimento microbiano em pelo menos 80% em relação ao meio de cultura sem o agente (GURI e PATEL, 1998). Os ingredientes ativos do PPM™ (isotiazolonas) interferem no ciclo do ácido cítrico e cadeia transportadora de elétrons, além de inibir o transporte de monossacarídeos e aminoácidos em fungos e bactérias. Por isso, este biocida é preferível, se comparado ao uso de antibióticos, pois esses últimos são mais caros, efetivos apenas contra bactérias, usualmente termolábeis e fitotóxicos, enquanto o PPM™ é eficiente contra um grande espectro de microrganismos, com menor fitotoxicidade (GURI e PATEL, 1998).

Resultados similares aos do presente trabalho foram obtidos em culturas de *Citrus sinensis* (NIEDZ e BAUSHER, 2002) e *Swietenia macrophylla* (FLORES, 2006), demonstrando a eficácia do PPM™. Para *Citrus sinensis*, o uso de 2% do biocida foi extremamente tóxico, inibindo completamente o desenvolvimento de gemas, sugerindo novamente que a toxicidade do PPM™, apesar de baixa, agrava-se conforme sua concentração.

O uso de PPM<sup>TM</sup>, portanto, é eficiente no combate de microrganismos em culturas *in vitro*, mesmo em suas menores concentrações. O biocida aumenta a sobrevivência dos explantes em relação ao tratamento controle, mas conforme sua concentração é aumentada e a contaminação é reduzida, os danos aos explantes são maiores. Por isso, foi padronizado o uso de 0,1% de PPM<sup>TM</sup> nos cultivos posteriores, com redução significativa da contaminação dos explantes, que variou entre 5 e 15%.

### 3.1.3 Efeito de antioxidantes e adsorventes adicionados ao meio de cultura WPM na oxidação de segmentos nodais

Ao final de 30 dias de cultura, 85% dos explantes em meio WPM sem antioxidantes apresentavam sinais de oxidação. Em 35% destes, a oxidação foi considerada intensa, não se restringindo apenas à base do explante (TABELA 3). O uso de 1 g.L<sup>-1</sup> de PVP-40 foi eficiente para evitar oxidação da base dos explantes com  $p < 0,01$  (ANEXO 10). Os tratamentos com PVP e ácido ascórbico evitaram que ocorresse oxidação intensa, quando os compostos fenólicos difundiam-se para o meio de cultura. O PVP também mostrou-se eficiente no caso de calos de *Eucalyptus tereticornis* (SUBBAIAH e MINOCHA, 1990), em diversos tipos de explantes de *Pouteria lucuma* (JORDAN e OYANEDEL, 1992) e para segmentos multinodais de *Leucadendron* (SUÁREZ et al., 2010).

TABELA 3 – EFEITO DE DIFERENTES ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AO MEIO DE CULTURA WPM NA OXIDAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Calophyllum brasiliense* APÓS 30 DIAS DE CULTURA.

ANTIOXIDANTE	CONCENTRAÇÃO	% DE EXPLANTES OXIDADOS	% DE OXIDAÇÃO INTENSA*
Controle	-	85 a	35 a
PVP-40	1 g.L <sup>-1</sup>	15 c	0 b
Carvão ativado	1 g.L <sup>-1</sup>	73 ab	29 ab
Cisteína	200 mg.L <sup>-1</sup>	74 ab	22 ab
Ácido cítrico	200 mg.L <sup>-1</sup>	77 a	41 a
Ácido ascórbico	200 mg.L <sup>-1</sup>	42 bc	0 b
Média	-	61%	21%
CV	-	26,92%	70,36%

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*Observada quando a oxidação difundia-se no meio de cultura, tornando-o escurecido

Explantos de espécies lenhosas, especialmente tropicais, são bastante suscetíveis ao escurecimento *in vitro*, resultado direto do estresse e de reações químicas induzidas por polifenoloxidasas e outras enzimas, sendo que os compostos fenólicos resultantes reagem com oxigênio, formando quininas, e geralmente são inibidores do crescimento das plantas (KRIKORIAN, 1988; AHMAD *et al.*, 2013; CHANG e SHU, 2013). A oxidação pode ser causada, ainda, pelo uso de hipoclorito de sódio na etapa de desinfestação, sendo o cloreto de mercúrio mais indicado nesse caso.

Diferentemente do observado para outras espécies, como por exemplo *Daphne* (NOSHAD *et al.*, 2009), o CA, na concentração de 1 g.L<sup>-1</sup>, não foi eficiente para reduzir a oxidação dos segmentos nodais de guanandi. Além disso, o CA provocou uma redução do desenvolvimento dos explantes e cerca de 50% de clorose seguida de necrose (dados não mostrados), assim como observado no caso de *Pistacia vera* e *P. atlantica* (MEDEROS-MOLINA e TRUJILLO, 1999). Esse fato indica que o CA pode ter adsorvido alguma substância essencial para o desenvolvimento das culturas.

Assim, apesar do CA e o PVP serem adsorventes, tais substâncias não mostraram a mesma efetividade na cultura do guanandi. Isso pode ser explicado pelo fato do CA adsorver várias substâncias, inibitórias ou não, não sendo seletivo para um composto em específico e adsorvendo também reguladores vegetais, minerais e vitaminas do meio de cultura (AZOIFEFA, 2009; ZHOU *et al.*, 2010). O PVP, por outro lado, é uma poliamida que previne a oxidação e polimerização de compostos fenólicos, sendo seletivo para esse tipo de substância (ZHOU *et al.*, 2010).

O ácido ascórbico (AA) mostrou-se efetivo no caso do guanandi, como para muitas outras espécies, como *Pterocarpus santalinus* (PRAKASH *et al.*, 2006), *Vicia faba* (ABDELWAHD *et al.*, 2008), *Leucadendron* sp. (SUÁREZ, PÉREZ-FRANCÉS e RODRÍGUES-PÉREZ, 2010) *Musa* sp. (CHANG e SHU, 2013). Além disso, explantes mantidos em meio de cultura contendo AA apresentaram maior vigor e as gemas desenvolveram-se mais rapidamente, se comparadas às dos demais



tratamentos (dados não mostrados). Isso pode ser explicado pelo fato do AA, além de sua ação como antioxidante, estar relacionado com crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando na divisão e alongamento celular (ALI e ALQURAINY, 2006). O AA não interage diretamente com polifenoloxidasas, mas previne o escurecimento das culturas por reduzir os substratos oxidados (AHMAD *et al.*, 2013). O AA age como redutor, captando peróxido de hidrogênio, superóxido, hidroxila e outros radicais oxigenados, atuando como um antioxidante chave de amplo espectro (ALI e ALQURAINY, 2006; GEORGE e DAVIES, 2006; SUARÉZ, PÉREZ-FRANCÉS e RODRÍGUEZ-PERÉZ, 2010).

Por outro lado, o ácido cítrico (AC) foi ineficiente no combate à oxidação em culturas de guanandi. Sua ação como antioxidante é baseada em sua habilidade de funcionar como agente quelante, captando íons que aumentam a oxidação, especialmente o cobre. Este metal, além de componente das polifenoloxidasas, também catalisa a reação de inativação do ácido ascórbico a partir do oxigênio molecular (RAJU e BAWA, 2006; GREGORY, 1996; NAWAR, 1996). Assim, o AC pode otimizar a ação antioxidante de outras substâncias, não inibindo diretamente este processo. Agentes quelantes são considerados sinérgicos, visto que aumentam a ação de antioxidantes, mas muitas vezes são inefetivos quando empregados sozinhos (LINDSAY, 1996).

Apesar da ação do aminoácido cisteína (Cis) como uma espécie de cofator para a produção de ácido ascórbico, sua ação na cultura de guanandi foi extremamente baixa, assemelhando-se ao tratamento sem uso de quaisquer antioxidantes. A Cis é componente das moléculas de glutathione, agindo indiretamente como antioxidante na remoção de peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas de oxigênio, incluindo oxigênio livre, superóxido e hidroxila. A glutathione atua nas defesas contra o estresse oxidativo devido a sua habilidade de regenerar o ácido ascórbico (ALI e ALQURAINY, 2006).

Ali e Alqurainy (2006) relataram que o efeito de alguns aminoácidos durante a oxidação de plantas ainda não é bem determinado e sugere-se que tais moléculas podem exibir potencial antioxidante apenas sob algumas condições de temperatura, pH ou concentração de oxigênio, não tendo efeito ou até mesmo promovendo a oxidação em outras condições. Portanto, as condições de cultivo e o pH do meio de cultura podem ser determinantes em sua ação, explicando a ineficiência da Cis como antioxidante.

### 3.2 MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES

O uso de 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais é necessário, uma vez que o número máximo de brotações por segmento nodal é baixo sem o uso desta citocinina, normalmente 2 por explante (FIGURA 2b). Houve diferença estatística (ANEXO 11) entre os tratamentos com BAP e o controle ( $p < 0,01$ ), mas os resultados não diferiram estatisticamente entre si para as três concentrações testadas (TABELA 4). A concentração de 11  $\mu\text{M}$  de BAP resultou na necrose de muitos explantes, além de um desenvolvimento mais lento das brotações (dados não mostrados).

TABELA 4 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BAP NO MEIO DE CULTURA WPM, NO NÚMERO DE BROTAÇÕES FORMADAS EM SEGMENTOS NODAIS DE *Calophyllum brasiliense* APÓS 90 DIAS DE CULTURA.

CONCENTRAÇÃO DE BAP ( $\mu\text{M}$ )	NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR SEGMENTO NODAL		
	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
0	1.7 (3) a	1.7 (3) a	2.0 (5) a
4,4	2.1 (5) ab	2.9 (6) b	4.4 (14) b
8,8	2.5 (6) b	3.0 (6) b	4.7 (18) b
11,0	2.4 (5) ab	3.2 (8) b	4.8 (13) b
Média	2.2	2.7	4.0
CV	24,5%	27,0%	34,6%

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os números entre parênteses indicam o número máximo de brotações em um único explante para cada tratamento.

Foi observado que a posição do explante na planta matriz influenciou o desenvolvimento dos segmentos nodais, sendo que explantes mais jovens (de posição mais apical) se mostraram menos responsivos, com desenvolvimento mais lento das gemas, do que os segmentos de posição mais basal (dados não mostrados).

Assim como para *Vitex negundo* (SAHOO e CHAND, 1998), *Pterocarpus santalinus* (PRAKASH *et al.*, 2006), *Wrightia tormentosa* (PUROHIT *et al.*, 1994) e carvalho (CHALUPA, 1984), a concentração de 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP estimulou a multiplicação de brotações e o alongamento foi maior nesse tratamento se comparado a concentrações maiores. Entretanto, optou-se pelo uso de 8,8  $\mu\text{M}$  devido ao maior número de brotações (FIGURA 2c), ainda que mais curtas, e a

manutenção da taxa de multiplicação, mesmo depois de 90 dias de cultura (dados não mostrados).

Comparando os resultados do presente trabalho aos da cultura de segmentos nodais de *C. apetalum*, onde o número máximo de brotações por explante foi de 5,3 após 5 semanas, mesmo com o uso de 13  $\mu$ M de BAP (NAIR e SEENI, 2003), concluímos que a taxa de multiplicação dos segmentos de guanandi é satisfatória, alcançando até 4 brotações por explante no mesmo período e 18 brotações por explante após 12 semanas. Porém, uma fase de alongamento se faz necessária para que as brotações muito pequenas (< 2 cm) possam ser individualizadas e transferidas para meio de enraizamento sem que ocorra necrose das mesmas. Testes preliminares indicam que a individualização de brotações muito curtas resulta em 100% de perda dos explantes.

### 3.4 ALONGAMENTO

#### 3.4.1 Uso de benzilaminopurina em meio WPM

Após 60 dias em meio de cultura WPM contendo de 4,4 a 11  $\mu$ M de BAP, as brotações não apresentaram nenhum sinal de alongamento, mantendo-se do mesmo tamanho em que estavam no final da etapa de multiplicação. Provavelmente há efeito residual da citocinina, já que os explantes permaneceram em meio de multiplicação por seis meses antes da transferência para alongamento. Mesmo no tratamento controle, não houve alongamento e as brotações permaneceram com tamanho inalterado por todo o tempo de cultivo.

Para o guanandi, porém, o período de 60 dias não foi suficiente para que o alongamento ocorresse, sugerindo a necessidade do uso de ácido giberélico ou de carvão ativado nessa etapa. Para *Calophyllum inophyllum*, explantes mantidos por 40 dias em meio de alongamento WPM ou WPM/2 sem reguladores apresentaram alongamento satisfatório, atingindo 4 cm de comprimento e posteriormente seguindo para enraizamento (THENGANE *et al.*, 2006a).

### 3.4.2 Uso de ácido giberélico em meio WPM

O ácido giberélico, utilizado em três concentrações na etapa de alongamento das brotações, foi prejudicial às culturas, uma vez que quase 100% dos explantes submetidos a tratamentos com este regulador sofreram necrose em até 30 dias. A necrose não ocorreu em brotações mantidas em meio WPM sem GA<sub>3</sub>. Além disso, não houve alongamento e, portanto, as brotações que permaneceram vivas não puderam ser individualizadas e transferidas para meio de enraizamento. Efeitos deletérios do GA<sub>3</sub> também foram observados durante o alongamento em cultura de calos de *Melia volkensii* (MULANDA *et al.*, 2012), porém com sintomas diferentes, como a produção de brotações anormalmente finas, baixa expansão foliar e baixas respostas foto e geotrópicas. Em cultura de segmentos apicais de *Lavandula angustifolia*, o aumento da concentração de GA<sub>3</sub>, atingindo 2,89 µM, resultou em maior oxidação dos explantes, indicando efeito fitotóxico do regulador (SILVA *et al.*, 2013).

O uso de 8,8 µM de BAP durante a etapa de multiplicação pode ter acarretado em efeito residual sobre os explantes, impedindo-os de alongar. A redução da concentração de BAP pode ser uma solução para o problema, uma vez que os explantes mantidos em meio WPM sem reguladores durante a multiplicação apresentaram brotações mais alongadas (FIGURA 2d). Além disso, manter os explantes durante vários subcultivos em meio sem regulador para que o efeito residual seja evitado ou reduzir a concentração de GA<sub>3</sub> utilizado durante a fase de alongamento pode ser suficiente para evitar a oxidação e necrose dos explantes. Em ambas as situações, a redução da concentração do regulador vegetal utilizado também oferece benefícios em relação aos custos do protocolo de micropropagação.

### 3.5 ENRAIZAMENTO

Após 60 dias de cultura, o enraizamento das brotações (FIGURA 2e) em meio WPM com ácido indolbutírico (AIB) ou ácido naftalenoacético (ANA) foi baixo, com uma média de 14%, atingindo um máximo de 24% (TABELA 5). Segundo a análise estatística (ANEXO 12), o uso de diferentes auxinas não teve influência sobre as taxas de enraizamento.

TABELA 5 – PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO E NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES POR EXPLANTE ENRAIZADO EM SEGMENTOS NODAIS DE *Calophyllum brasiliense*, CONFORME TRATAMENTO COM DUAS AUXINAS E CONCENTRAÇÕES EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 60 DIAS DE CULTURA

TRATAMENTO	% DE ENRAIZAMENTO	NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES POR EXPLANTE ENRAIZADO
10 µM AIB	8,0 <sup>ns</sup>	1,5 (2) <sup>ns</sup>
20 µM AIB	8,0 <sup>ns</sup>	3,5 (4) <sup>ns</sup>
10 µM ANA	24,0 <sup>ns</sup>	1,8 (5) <sup>ns</sup>
20 µM ANA	16,0 <sup>ns</sup>	2,3 (3) <sup>ns</sup>
Média	14,0%	1,1 <sup>ns</sup>
CV	142,86%	126,82%

\*Os explantes foram mantidos por 7 dias no escuro em meio com auxina, posteriormente transferidos para a luz. Foi aplicado teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os números entre parênteses indicam o número máximo de raízes em um único explante de cada tratamento.

<sup>ns</sup>. Não significativo.

O enraizamento de brotos produzidos *in vitro* é uma etapa delicada da micropropagação, sendo que as auxinas são indispensáveis para a maioria das espécies lenhosas, naturalmente difíceis de enraizar (MAYNARD e BASSUK, 1991; DE KLERK, 2002; NAS e READ, 2004). Em testes preliminares, não houve enraizamento de explantes mantidos em meio de cultura sem adição de auxinas.

Para *Calophyllum brasiliense*, as raízes formadas com ANA e AIB foram semelhantes, mas o ANA induziu a formação de calos em quase todos os explantes. Para *Garcinia indica* (MALIK *et al.*, 2005) e *G. mangostana* (GOH e LOH, 1990), o ANA induziu raízes mais curtas e finas do que o AIB, além de causar formação de calos em ambas as espécies. No caso de enraizamento de explantes foliares de *Garcinia quaesita*, nenhum dos dois reguladores foi eficiente, e nenhuma brotação micropropagada produziu raízes (FARZANA *et al.*, 2010). Plantas lenhosas são difíceis de enraizar e é necessário ajustar o protocolo para esta etapa para que se obtenha bons resultados.

Às vezes, as brotações precisam ser especialmente alongadas antes do enraizamento (GEORGE e DEBERGH, 2008). Portanto, a etapa de alongamento é extremamente importante para o guanandi, já que as brotações produzidas durante a multiplicação geralmente são curtas (< 2 cm). O baixo enraizamento pode ser evitado com o aumento na concentração de auxinas exógenas, redução da concentração dos sais do meio de cultura ou redução do tempo de permanência dos explantes na presença de auxinas, já que os reguladores se tornam inibitórios do

crescimento radicular após um certo período, variável conforme a espécie (DE KLERK, 2002).

### 3.6 ACLIMATIZAÇÃO

Após 30 dias em casa de vegetação, a taxa de sobrevivência das plantas enraizadas de guanandi foi de 78,9%, resultado semelhante aos 80% de sobrevivência obtidos com plantas de *Calophyllum inophyllum* aclimatizadas em uma mistura a 1:1:1 de solo, casca de coco e areia (THENGANE *et al.*, 2006a). Depois de um ano, 60% das plantas enraizadas de guanandi sobreviveram em casa de vegetação. Esse número cai para 27% no caso das brotações não-enraizadas. Para *Garcinia indica*, a sobrevivência foi um pouco maior, de 90% em substrato composto por esterco, solo e vermiculita em proporção 1:1:1 (MALIK *et al.*, 2004) ou mistura 1:1 de solo e areia (THENGANE *et al.*, 2006b). Em estudo de Chabukswar e Deodhar (2005), a sobrevivência de plantas de *G. indica*, após 30 dias, foi de no máximo 76,2% em substrato de fibra de coco, e de 75% em mistura de fibra de coco e areia (1:1).

A sobrevivência da espécie é alta após a transferência direta do ambiente *in vitro* para casa de vegetação, sem qualquer pré-tratamento ou rustificação (FIGURA 2f). Isso indica que, diferentemente de muitas espécies lenhosas, a etapa de aclimatização é relativamente simples e fácil. As etapas de multiplicação, alongamento e enraizamento são, portanto, os processos mais delicados durante a micropropagação da espécie, uma vez que limitam a produção massal de plantas.

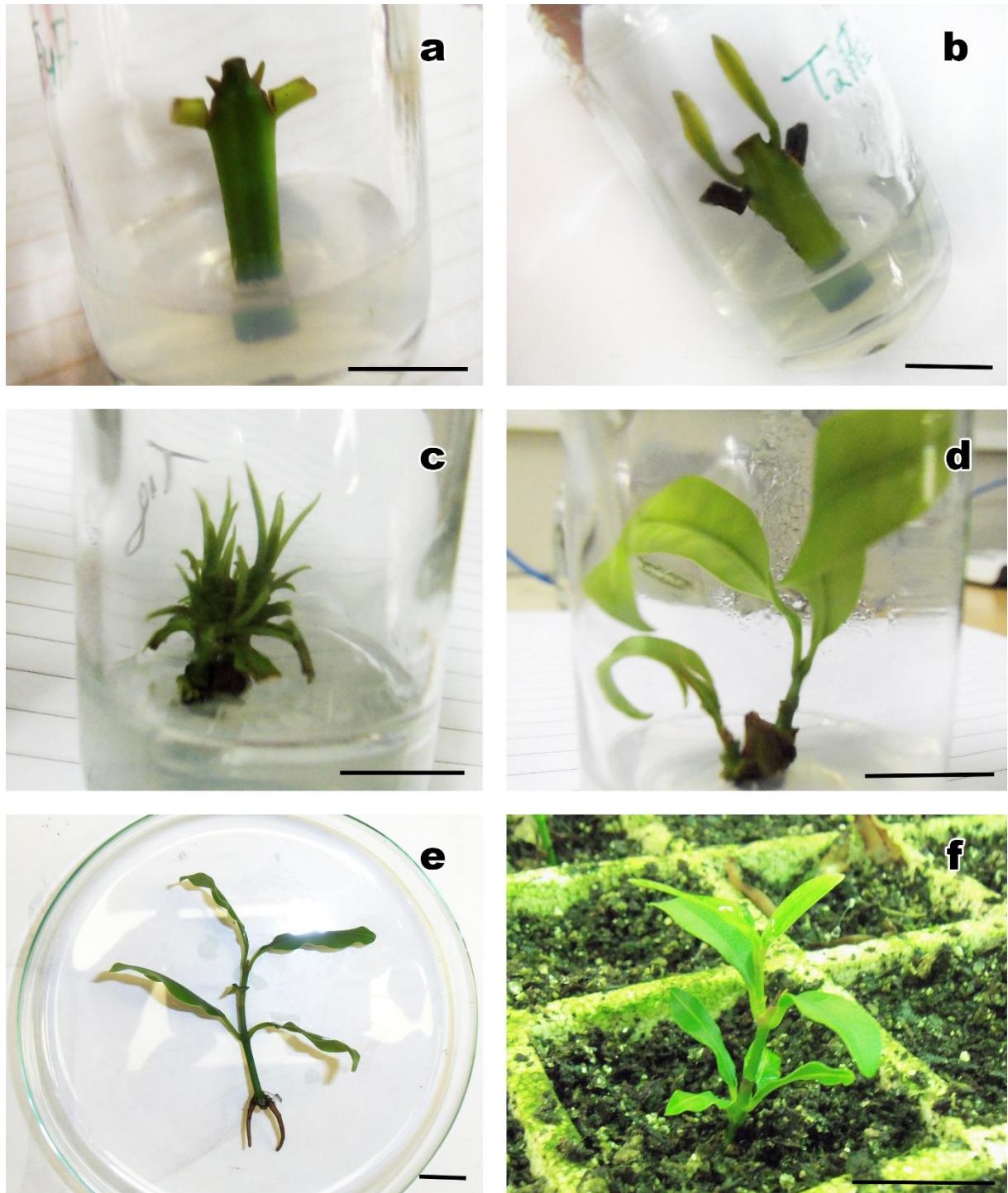


FIGURA 2 – ETAPAS DA MICROPROPAGAÇÃO DE *Calophyllum brasiliense*; SEGMENTO NODAL INTRODUZIDO *IN VITRO* EM MEIO WPM SEM REGULADORES (a); EXPLANTE MANTIDO EM MEIO WPM SEM REGULADORES, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*, EVIDENCIANDO O ALONGAMENTO DAS GEMAS AXILARES (b); EM MEIO WPM COM 8,8  $\mu\text{M}$  DE BAP, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*, COM FORMAÇÃO DE VÁRIAS BROTAÇÕES (c); BROTAÇÃO ALONGADA, PROVENIENTE DE MEIO WPM SEM BAP (d); EXPLANTE ENRAIZADO APÓS 7 DIAS EM MEIO COM 20  $\mu\text{M}$  DE ANA E 60 EM MEIO WPM SEM REGULADORES (e); PLANTA ACLIMATIZADA EM MISTURA 1:1 DE PLANTMAX® E VERMICULITA, 6 MESES APÓS TRANSPLANTIO (f). BARRA: 1 CM.

FONTE: o autor (2013)

## 4 CONCLUSÕES

A micropropagação de guanandi é possível por meio do uso de segmentos nodais obtidos de plantas mantidas em casa de vegetação. O biocida PPM™ pode ser adicionado ao meio de cultura para reduzir a contaminação dos explantes, sendo a concentração de 0,1% eficiente. Além disso, a desinfestação requer o uso de cloreto de mercúrio, pois o hipoclorito de sódio não é suficiente para reduzir a contaminação, resultando ainda em necrose dos explantes quando altas concentrações são utilizadas. A concentração de 0,1 de  $\text{HgCl}_2$ , durante 8 minutos, é indicada para a desinfestação.

A adição de PVP ou ácido ascórbico ao meio de cultura é recomendada para evitar a oxidação dos explantes. Durante a multiplicação, é importante adicionar BAP ao meio de cultura para promover a produção de brotos, uma vez que as brotações são escassas sem o uso do regulador. A BAP deve ser utilizada em concentrações de até 8,8  $\mu\text{M}$ , pois concentrações acima desta resultam em necrose e menor vigor dos explantes.

As brotações obtidas da multiplicação geralmente são curtas e uma fase de alongamento é necessária. Contudo, a redução da concentração de BAP ou adição de  $\text{GA}_3$  ao meio de cultura não são eficientes para promover o alongamento. O enraizamento das brotações é baixo, e deve-se buscar alternativas para que sua taxa seja aumentada, como reduzir a concentração de sacarose no meio de cultura. Por outro lado, a sobrevivência de plantas micropropagadas é elevada, sugerindo que, para o guanandi, as etapas de alongamento e enraizamento são as mais cruciais para sua produção em larga escala.



## REFERÊNCIAS

- ABDELWAHD, R.; HAKAM, N.; LABHILILI, M.; UDUPA, S. M. Use of and adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.8, p.997-1002, 2008.
- AFTAB, F.; PREECE, J. H. Forcing and *in vitro* establishment of softwood shoots from large stem segments of woody plants. **Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond**, p.437-444, 2007.
- AHMAD, I.; HUSSAIN, T.; ASHRAF, I.; NAFEES, M.; MARYAM; RAFAY, M.; IQBAL, M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v.13, n.4, p.539-547, 2013.
- AHMAD, T.; UR-RAHMAN, H.; AHMED, CH. M. S.; LAGHARI, M. H. Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF 677. **Pakistan Journal of Botany**, v.35, n.3, p.331-338, 2003.
- ALI, A. A.; ALQURAINY, F. Activities of antioxidants in plants under environmental stress. *In: The lutein-prevention and treatment for diseases*, India, Transworld Research Network, p. 187-256, 2006.
- AZOIFEFA, A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. **Agronomía mesoamericana**, v.20, n.1, p. 153-175, 2009.
- BRENZAN, M. A.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M. C. M.; CÔRREA, A. G.; ALVIM JÚNIOR, J.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; CORTEZ, D. A. G. Effects of (-) mammea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. **Phytomedicine**, v.19, p.223-230, 2012.
- CARVALHO, L. R.; DA SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação das sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista brasileira de sementes**, Pelotas, v.28, n.2, p.15-25, 2006.
- CHABUKSWAR, M. M.; DEODHAR, M. A. Rooting and hardening of *in vitro* plantlets of *Garcinia indica* Choisy. **Indian Journal of Biotechnology**, v.4, p.409-413, 2005.
- CHALUPA, V. *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). **Biologia Plantarum**, v.26, n.5, p.374-377, 1984.
- CHANG, S.; SHU, H. A method to suppress the browning in banana (*Musa*, AAA) embryogenic callus induced. **Research Journal of Biotechnology**, v.8, n.4, p. 63-69, 2013.
- DE KLERK, G. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v.38, p.415-422, 2002.

FARZANA, A. F. R.; BANDARA, R. M. I. E. K.; ALUWIHARE, P. C.; EESWARA, J. P. In vitro regeneration of shoots from *Garcinia quaesita* leaf explants. **Journal of Natural Science Foundation of Sri Lanka**, v.38, n.3, p.157-162, 2010.

FISCHER, E.; DOS SANTOS, F. A. M. Demography, phenology and sex of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) trees in the Atlantic forest. **Journal of Tropical Ecology**, v. 17, p.903-909, 2001.

FLORES, E. M. *Calophyllum brasiliense* Cambess. In: VOZZO, J. A. (Ed.). **Tropical tree seed manual**. Washington: USDA Forest Service, 2002. p. 353-356.

FLORES, J. P. **Inducing resistance of Spanish cedar *Cedrela odorata* L. and mahogany *Swietenia macrophylla* King against *Hypsipyla grandella* (Zeller) by grafting**. 130 f. Thesis (Doctor in Philosophy) – Major in Plant Sciences, University of Idaho, Idaho, 2006.

GEORGE, E. F.; DAVIES, W. Effects of the physical environment In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p.423-464.

GEORGE, E. F. DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p.19-64.

GOH, H. K.; LOH, C. S. Direct shoot bud formation from leaf explants of seedlings and mature mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) trees. **Plant Science**, v.68, p.113-121, 1990.

GREGORY, J. F. Vitamins In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1996. p. 531-616.

GURI, A. Z.; PATEL, K. N. Composition and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. United States Patent 5.750.402, 2 Jun. 1995, 12 Maio 1998.

ILIEV I.; GAJDOSOVÁ, A.; LIBIAKOVÁ, G.; JAIN, S. M. Plant micropropagation In: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. (Ed.). **Plant cell culture: essential methods**. Garsington Road, Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 1-23.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; FILHO, V. C.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis*: structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v.65, p.267-272, 2002.

JORDAN, M.; OYANEDEL, E. Regeneration of *Pouteria lucuma* (Sapotaceae) plants in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.31, p.249-252, 1992.

KING, R. Succession and micro-elevation effects on seedling establishment of *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) in an amazonian river meander forest. **Biotropica**, v.35, n.4, p.462-471, 2003.

KRIKORIAN, A. D. Plant tissue culture: perceptions and realities. **Proceedings of the Indian Academy of Science**, v.98, n.6, p.425-464, 1988.

LINDSAY, R. C. Food Additives *In*: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1996. p. 767-824.

LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1980.

MACHAKOVA, I.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators I: introduction; Auxins, their analogues and inhibitors *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

MALIK, S. K.; CHAUDHURY, R.; KALIA, R. K. Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: a tropical medicinal tree species. **Scientia Horticulturae**, v.106, p.539-553, 2005.

MAYNARD, B. K.; BASSUK, N. L. Stock plant etiolation and stem banding effect on the auxin dose-response of rooting in stem cuttings of *Carpinus betulus* L 'Fastigiata'. **Plant Growth Regulators**, v.10, p.305-311, 1991.

MEDEROS-MOLINA, S.; TRUJILLO, M. I. Elimination of browning exudate and in vitro development of shoots in *Pistacia vera* L. cv. Mateur and *Pistacia atlantica* desf. culture. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.68, n.1, p.21-24, 1999.

MNG'OMBA, S. A.; SILESHI, G.; du TOIT, E. S.; AKINNINFESI, F. K. Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures *In*: DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNERSELVAN, A. **Fungicides for plant and animal diseases**. InTech: Janeza Trdine, Croatia, 2012. p.245-254.

MOSHKOV, I. E.; NOVIKOVA, G. V.; HALL, M. A.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; miscellaneous compounds *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

MULANDA, E. S.; ADERO, M. O.; AMUGUNE, N. O.; AKUNDA, E.; KINYAMARIO, J. I. High-frequency regeneration of the drought-tolerant tree *Melia volkensii* Gurke using low-cost agrochemical thidiazuron. **Biotechnology Research International**, p. 2012 (818472).

NAIR, L. G.; SEENI, S. *In vitro* multiplication of *Calophyllum apetalum* (Clusiaceae), an endemic medicinal tree of the Western Ghats. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.78, n.2, p.169-174, 2003.

NAS, M. N., READ, P. E. Improved rooting and acclimatization of micropropagated hazelnut shoots. **HortScience**, v.39, n.7, p.1688-1690, 2004.

NAWAR, W. W. Lipids *In*: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1996. p. 225-320.

NEONDO, J.; MACHUA, J.; MUIGAI, A.; NYENDE, A. B.; MUNJUGA, M.; JAMNADASS, R.; MUCHUGI, A. Micropropagation of *Allanblackia stuhmannii*: amenability to tissue culture technique. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research**, v.2, n.11, p.185-194, 2011.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F.; DOUSSEAU, S.; VIEIRA, C. V. Efeito da temperatura e do tegumento na germinação de sementes de *Calophyllum brasiliense*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1872-1877, 2007.

NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 38, p.468-471, 2002.

NOLDIN, V. F.; ISAÍAS, D. B.; FILHO, V. C. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Química Nova**, v.29, n.3, p.549-554, 2006.

NOSHAD, D.; MIREMAILI, S.; RISEMAN, A.; EKRAMODDOULLAH, A. *In vitro* propagation of seven *Daphne* L. species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.96, p.201-209, 2009.

PRAKASH, E.; KHAN, P. S. S.V.; RAO, T. J. V. S.; MERU, E. S. Micropropagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using mature nodal explants. **Journal of Forest Research**, v.11, p.329-335, 2006.

PUROHIT, S. D.; KUKDA, G.; SHARMA, P.; TAK, K. *In vitro* propagation of an adult tree *Wrightia tormentosa* through enhanced axillary branching. **Plant Science**, n.103, p.67-72, 1994.

RAJU, P. S.; BAWA, A. S. Food additives in fruit processing *In*: HUI, Y. H. **Handbook of fruits and fruits processing**. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.

RATHORE, M. S.; RATHORE, M. S.; SHEKHAWAT, N. S. *Ex vivo* implications of phytormones on various *in vitro* responses in *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight. & Arn. - an endangered plant. **Environmental and Experimental Botany**, v. 86, p.86-93, 2013.

SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. **Plant Cell Reports**, n.18, p.301-307, 1998.

SCARANO, F. R. RIBEIRO, K. T. MORAES, L. F. D.; LIMA, H. C. Plant establishment on flooded and unflooded patches of a freshwater swamp forest in southeastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v.13, n.6, p. 793-803, 1997.

SILVA, A. L. L.; RODRIGUES, C.; COSTA, J. L.; MACHADO, M. P.; PENHA, R. O.; BIASI, L. A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Gibberellic acid fermented extract obtained by solid-state fermentation using citric pulp by *Fusarium moniliforme*:

influence on *Lavandula angustifolia* Mill., cultivated *in vitro*. **Pakistan Journal of Botany**, v.45, n.6, p.2057-2064, 2013.

SILVA, P. P.; CONTIM, L. A. S.; FREITAS, D. V.; ARIDE, P. H. R.; SANTOS, A. L. W. Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn). **Scientia Agraria**, v.11, n.6, p.437-443, 2010.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. 2 ed, San Diego, CA: Academic Press, 2000.

SOUZA, M. C.; BESERRA, A. M. S.; MARTINS, D. C.; REAL, V. V.; DOS SANTOS, R. A. N.; RAO, V. S.; DA SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.452-458, 2009.

SUÁREZ, E.; PÉREZ-FRANCÉS, J. F.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, J. A. Use of multinodal explants for micropropagation of *Leucodendron* 'Safari Sunset'. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.8, n.3, p.790-796, 2010.

SUBBAIAH, M. M.; MINOCHA, S. C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, v.9, p.370-373, 1990.

THENGANE, S. R.; BHOSLE, S. V.; DEODHAR, S. R.; PAWAR, K. D.; KULKARNI, D. K. Micropropagation of Indian laurel (*Calophyllum inophyllum*), a source of anti-HIV compounds. **Current Science**, v.90, n.10, p.1393-1397, 2006a.

THENGANE, S. R.; DEODHAR, S. R.; BHOSLE, S. V.; RAWAL, S. K. Repetitive somatic embryogenesis and plant regeneration in *Garcinia indica* Choiss. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, n.42, p.256-261, 2006b.

VAN STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

ZHOU, B.; WEI, X.; WANG, R.; JIA, J. Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v.5, n.3, p. 109-116, 2010.

### CAPÍTULO 3

## ANÁLISE GENÉTICA DA CAPACIDADE DE ENRAIZAMENTO DE CULTURAS *IN VITRO* DE *Calophyllum brasiliense* (CAMBESS.) A PARTIR DO USO DE MARCADORES RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*)

### RESUMO

Análises utilizando marcadores RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) são simples, eficientes e baratas se comparadas a outras técnicas moleculares. Além disso, não é necessário ter conhecimento prévio sobre o genoma do organismo a ser estudado, o que é especialmente importante para espécies florestais nativas, para as quais não se dispõe de informações moleculares suficientes. O objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores RAPD que possam ser empregados para identificação de genótipos mais responsivos às auxinas usadas durante o enraizamento. Folhas jovens de 74 plantas mantidas em casa de vegetação e de 120 plantas micropropagadas, após fase de enraizamento, foram coletadas e utilizadas para análise de DNA. As folhas foram maceradas conforme protocolo utilizando CTAB a 2%. No caso das plantas *in vitro*, o nitrogênio líquido foi substituído por armazenamento em freezer a -80°C durante meia hora antes de iniciar a maceração, e PVP foi adicionado às folhas para evitar a oxidação. Foram utilizados 4 primers decâmeros para a análise RAPD (OPA 1, OPC 10, OPE 20 e OPJ 19) e os loci foram identificados visualmente. Foram encontrados 26 loci, dos quais 21 são polimórficos (87,5%), com um número médio de alelos observados de 1,87 e um número de alelos efetivos por loci de 1,39. A diversidade genética de Nei foi de 0,24, valor semelhante ao apresentado por populações naturais. A substituição do nitrogênio por armazenamento a -80°C, juntamente com a adição de PVP, foi eficiente para evitar a oxidação das amostras, com obtenção de DNA de maior qualidade. A partir do método UPGMA, três amostras de plantas enraizadas foram agrupadas, juntamente com duas não enraizadas. Durante a etapa de enraizamento, as plantas que permaneceram em meio de cultura contendo AIB não formaram raízes, enquanto as amostras expostas a ANA enraizaram, sugerindo uma interação entre o genótipo e a resposta à auxina utilizada durante a cultura. O método Neighbor-joining também agrupou três plantas enraizadas, duas das quais agrupadas na análise UPGMA, além de duas plantas de casa de vegetação. Essa proximidade com as plantas de casa de vegetação pode indicar um grupo de matrizes particularmente responsivo à auxina presente no meio de cultura *in vitro*, uma vez que sejam geneticamente aparentadas. Novas análises são necessárias para determinar a presença de um marcador que identifique plantas mais suscetíveis ao enraizamento *in vitro*, e novos primers podem ser utilizados. Além disso, sugere-se o uso de novos marcadores, mais precisos, para dar continuidade ao trabalho.

Palavras-chave: Cultura *in vitro*, guanandi, PVP, RAPD

### CHAPTER 3

## GENETIC ANALYSIS OF ROOTING CAPACITY OF *IN VITRO* CULTURES OF *Calophyllum brasiliense* (CAMBESS.) USING RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) MARKERS

### ABSTRACT

Analyzes using RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) are simple, efficient and inexpensive when compared to other molecular techniques. Moreover, it is not necessary to have a prior knowledge of the genome of the organism being studied, which is especially important for native species, for which there is no sufficient molecular information. Present study objective was identify RAPD markers for identification of genotypes more responsive to auxins used during rooting phase. Young leaves of 74 plants kept in the greenhouse and 120 micropropagated plants after rooting phase were collected and used for DNA analysis. The leaves were macerated using CTAB protocol as 2%. In the case of *in vitro* plants, liquid nitrogen was replaced by storage in a freezer at -80°C for half an hour before the start of mashing, and PVP was added to the leaves to prevent oxidation. Four decamer primers were used for RAPD analysis (OPA 1, OPC 10, OPE 20 and OPJ 19) and 26 loci were visually identified, of which 21 were polymorphic (87.5 %), with an average observed number of alleles of 1.87 and effective number of alleles of 1.39 per loci. The Nei genetic diversity was 0.24. The substitution of nitrogen for storage at -80°C, along with the addition of PVP, was effective to prevent oxidation of the samples, obtaining higher quality DNA. From the UPGMA method, three samples of rooted plants were grouped together with two unrooted. During the step of *in vitro* rooting, the plants remained in a culture medium containing IBA did not form roots, while the plants exposed to NAA rooted, suggesting an interaction between the genotype and response to auxin used in culture. The Neighbor-joining method also grouped three rooted plants, two of which are grouped in the UPGMA analysis, and two plants from greenhouse. This proximity to the greenhouse plants may indicate a group of matrix plants particularly responsive to the auxin present in the culture medium, since they are genetically related. Further analyzes are necessary to determine the presence of a marker that identifies the plants more susceptible to *in vitro* rooting, and new primers can be used. Furthermore, we suggest the use of new markers, more accurate, to continue this study.

Keywords: Guanandi, *in vitro* culture, PVP, RAPD

## 1 INTRODUÇÃO

Marcadores moleculares tornaram-se comumente utilizados em estudos de diversidade genética, incluindo uma vasta gama de propósitos que vão desde questões taxonômicas, passando por compreensão de dinâmicas populacionais e se estendem até questões de variação somaclonal (AVISE, 2004; KUMAR *et al.*, 2009). Entre os marcadores moleculares disponíveis, estão o RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), o RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), o AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), além de marcadores de microsatélites.

O RAPD é um tipo de reação de cadeia de polimerase (PCR) que se baseia no princípio de que um primer curto liga-se a muitos loci diferentes, amplificando randomicamente sequências de uma amostra de DNA complexa (SENTHIL KUMAR e GURUSUBRAMANIAN, 2011). Marcadores RAPD são oligonucleotídeos decâmeros (com 10 nucleotídeos) que, por serem curtos, potencialmente ligam-se a muitos loci da amostra de DNA, aleatoriamente (SENTHIL KUMAR e GURUSUBRAMANIAN, 2011).

Análises de marcadores RAPD são relativamente simples, eficientes, baratas e rápidas em comparação a outras técnicas (LYNCH e MILLIGAN, 1999; BARDAKCI, 2001; KUMAR *et al.*, 2009). Além disso, não é necessário ter conhecimento prévio sobre o genoma do organismo a ser estudado (BARDAKCI, 2001; SENTHIL KUMAR e GURUSUBRAMANIAN, 2011), o que é especialmente importante para espécies florestais nativas, para as quais não se dispõe de informações moleculares suficientes. Esse tipo de marcador pode ser utilizado para mapear os genes envolvidos na competência *in vitro* das plantas, comparando-se os resultados moleculares com a habilidade e responsividade de cada explante (HENRY, VAIN e DE BUYSER, 1994).

Por se tratar de um marcador dominante, a técnica de RAPD não pode ser usada para identificar diretamente indivíduos heterozigotos (LYNCH e MILLIGAN, 1999; BARDAKCI, 2001; SENTHIL KUMAR e GURUSUBRAMANIAN, 2011). Para contornar essa limitação, pode lançar mão do pressuposto do equilíbrio de Hardy Weinberg para avaliações de diversidade alélica (FRANKHAM, BALLOU e BRISCOE, 2004). Outra dificuldade é a necessidade de amostras de DNA com alto grau de pureza para a reprodutibilidade das análises (KUMAR *et al.*, 2009). Contudo, a técnica já foi aplicada em culturas de várias espécies, incluindo *Populus deltoides*



(RANI, PARIDA e RAINA, 1995), *Hypericum perforatum* (GOEL, KUKREJA e BISHT, 2006), *Gypsophila paniculata* (BARAKAT e EL-SAMMAK, 2011) e *Prunus armeniaca* (SOLIMAN, 2012).

As evidências disponíveis levam à conclusão que a competência das culturas *in vitro* é um traço herdável (HENRY, VAIN e DE BUYSER, 1994). Diferentes genótipos de uma mesma espécie se comportam de maneira diferente no ambiente *in vitro*, como demonstrado para linho (CHAKRAVARTY e SRIVASTAVA, 1997), feijão-de-corda (BRAR *et al.*, 1999), sorgo (ARULSELVI e KRISHNAVENI, 2009) e berinjela (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2010). Tal abordagem, porém, é pouco comum para espécies florestais, especialmente nativas, e se restringe basicamente a cultivares comerciais. Assim, o objetivo do presente estudo é identificar marcadores RAPD que possam ser empregados para identificação e seleção de genótipos particularmente responsivos às auxinas usadas durante o enraizamento.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas jovens de 74 plantas de guanandi mantidas em casa de vegetação, com 3 anos de idade, e 120 plantas micropropagadas foram coletadas e utilizadas para análise de DNA. Todas as plantas de casa de vegetação foram utilizadas como matrizes para obtenção de segmentos nodais utilizados como material inicial durante a micropropagação. As folhas de plantas micropropagadas foram coletadas após a etapa de enraizamento, depois de serem mantidas por 7 dias em meio com auxinas ácido indolbutírico (AIB) ou ácido naftalenoacético (ANA), a 10 ou 20  $\mu\text{M}$ , e transferidas para meio sem reguladores, onde permaneceram por 60 dias. Foram utilizados explantes enraizados e não enraizados. As análises foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Florestas, em Colombo (PR).

## 2.1 EXTRAÇÃO DE DNA FOLIAR

### 2.1 Plantas mantidas em casa de vegetação

Para o processamento das amostras, foi utilizado o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1995). Folhas de plantas-matrizes mantidas em casa de vegetação foram cortadas com bisturi e foram utilizados 150 a 300 mg de cada amostra. As porções de folha foram maceradas em graal com adição de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para tubos eppendorf de 1,5 ml, aos quais foi adicionado 700  $\mu$ L de solução CTAB a 2%, previamente aquecida em banho-maria a 65°C, juntamente com 1,4  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. As amostras foram mantidas em banho-maria a 65°C durante 1 hora, sendo agitadas a cada 5-10 minutos.

Em cada amostra, 600  $\mu$ L de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) foi adicionado. A mistura de soluções foi homogeneizada por inversão. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi pipetado para novo tubo eppendorf de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 800  $\mu$ L de isopropanol gelado (4°C). As amostras foram levadas ao freezer, onde permaneceram de 12 a 20 horas.

As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 500  $\mu$ L de etanol 70% e realizada nova centrifugação por 5 minutos. O etanol foi descartado e a operação foi repetida duas vezes, sendo que na última o etanol 70% foi substituído por etanol absoluto.

Depois da retirada do álcool, os frascos foram submetidos à secagem. O pellet foi ressuspenso em 50  $\mu$ L de água ultrapura e as amostras foram incubadas a 37°C durante 1 hora, sendo depois armazenadas em freezer a -20°C.

### 2.2 Plantas micropropagadas

A extração de DNA foliar foi realizada como acima, exceto pelas alterações que seguem. Não foi utilizado nitrogênio líquido para maceração das amostras, os tubos sendo colocados em freezer a -80°C durante meia hora antes de iniciar a maceração. Durante esta etapa, foram adicionados cerca de 200 mg de

polivinilpirrolidona (PVP) às amostras, de modo a evitar a oxidação, como indicado por Sahu, Thangaraj e Kathiresan (2012).

## 2.2 ANÁLISE DE RAPD

Para a análise de RAPD, foram utilizados 4 primers decâmeros (Operon Technologies Inc.), segundo o protocolo de Schühli *et al.* (2013). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti® 96-well) com as concentrações por amostra que seguem: 1x tampão PCR, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs (cada), 0,5 µM de primer, 1 unidade de Taq polimerase, 4 µL de amostra de DNA (20 ng.µL<sup>-1</sup>) e água ultrapura para completar 25 µL, conforme trabalho de Schühli *et al.* (2013) para a mesma espécie.

As amplificações foram efetuadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 92°C por 4 minutos. Depois de 40 ciclos de 92°C por 1 min seguido de 1,5 min a 35°C e 2 minutos a 72°C, foi realizada uma etapa de extensão a 72° por 5 minutos e, finalmente, as amostras foram mantidas a 4°C (adaptado de SCHÜHLI *et al.*, 2013).

Foram adicionados 3 µL de azul de bromofenol a 10 µL de cada produto da amplificação. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, acrescido de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de brometo de etídio, em cuba de 90 mL. Como marcador de peso molecular, foi utilizado ladder de 1kb (Invitrogen). Foi utilizado tampão TBE 1x (Tris-borato 90 mM, EDTA 1mM), a 80 V, durante 1 a 2 horas. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta. O processo todo foi repetido de uma a três vezes para cada amostra.

Os loci foram identificados visualmente e os dados obtidos foram organizados em uma matriz binária contendo 120 indivíduos provenientes de cultura *in vitro* (VTR) e 74 indivíduos de casa de vegetação (CVG), além dos loci encontrados. Entre as análises, foram incluídos também os caracteres “vigor” e “enraizamento” observados para cada indivíduo *in vitro*, como alternativa à matriz contendo apenas os loci. Os conjuntos de caracteres (OPA 1, OPC 10, OPE 20 e OPJ 19) foram analisados em sua totalidade, bem como separadamente, para avaliação de congruência.

O programa PAUP versão 4b10 (SWOFFORD, 2003) foi utilizado para as análises, aplicando-se o uso de distâncias de Nei Li (NEI e LI, 1979). Para construção de árvores baseadas em distâncias genéticas, foram utilizados os algoritmos de agrupamento UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*) e NJ (*Neighbor-joining*), comumente utilizados para análise de populações naturais em estudos ecológicos e taxonômicos. Para estimativas de similaridades genéticas entre os indivíduos foi utilizado o programa Popgene 1.32 (YEH *et al.*, 1997).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quatro primers utilizados resultaram em amplificação efetiva, com as sequências e números de loci apresentados abaixo (TABELA 1). Os dados foram organizados em uma matriz binária, contendo 194 indivíduos e 26 loci, além da característica “enraizamento”, nos casos das plantas *in vitro*. Foram encontrados 21 loci polimórficos (87,5%), com um número médio de alelos observados de 1,87 e 1,39 alelos efetivos por loci. A diversidade genética de Nei foi de 0,24, valor característico de material selvagem, semelhante àquela encontrada em ambientes naturais (SCHÜHLI *et al.*, 2013). O primer OPE 20 amplificou o menor número de loci (3), enquanto OPC 10 resultou em 9 (FIGURA 1).

TABELA 1 – PRIMERS USADOS EM REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE (PCR), SEQUÊNCIAS E NÚMERO DE LOCI

Primer	Sequência (5'-3')	Número de loci
OPA 01	CACGCCCTTC	7
OPC 10	TGTCTGGGTG	9
OPE 20	AACGGTGACC	3
OPJ 19	GGACACCACT	7
Total	-	26

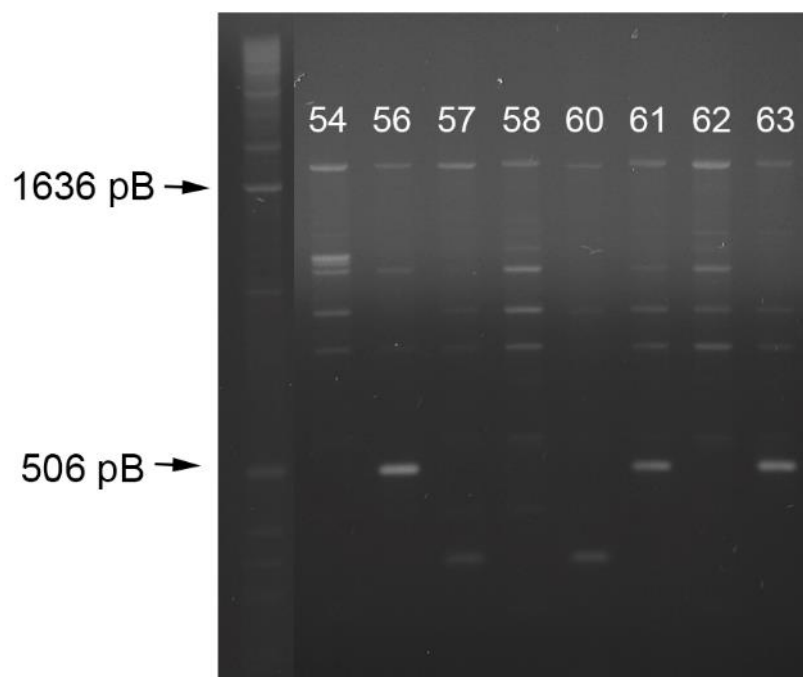


FIGURA 1 – PADRÕES DE BANDAS PARA ANÁLISE RAPD DE 8 AMOSTRAS OBTIDAS DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE GUANANDI, UTILIZANDO O PRIMER OPC 10.  
 FONTE: o autor (2013)

### 3.1 EXTRAÇÃO DE DNA FOLIAR

Não foi possível visualizar bandas de um grande número de amostras provenientes de plantas mantidas em casa de vegetação, ainda que novas extrações fossem realizadas. Os pellets isolados possuíam cor marrom ou amarelada. Isso pode indicar alta taxa de oxidação do material vegetal, uma vez que polifenóis e polissacarídeos se ligam fortemente aos ácidos nucleicos durante a extração e interferem nos processos subsequentes (PIRTTILÄ *et al.*, 2001). Ainda que o protocolo utilizado contenha PVP e  $\beta$ -mercaptoetanol, que previnem a oxidação de metabólitos secundários (PIRTTILÄ *et al.*, 2001), sua concentração pode ter sido insuficiente para controlar a oxidação em folhas de guanandi.

A adição de PVP durante a maceração das amostras de plantas *in vitro* foi eficiente para controlar a oxidação, uma vez que os pellets obtidos eram brancos. Este composto forma pontes de hidrogênio complexas com os compostos fenólicos, que posteriormente são separados por centrifugação (MALIYAKAL, 1992).

Durante o processo, a substituição do uso de nitrogênio líquido, um produto relativamente caro, pelo armazenamento das amostras em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  foi eficaz

para obtenção de amostras mais puras. Segundo Sahu, Thangaraj e Kathiresan (2012), o PVP reduz a degradação de DNA.

### 3.2 ANÁLISE UPGMA

A partir do método UPGMA, as amostras de plantas enraizadas 69 V, 93 V e 102 V foram agrupadas, juntamente com 8 V e 24 V (FIGURA 2, ramos em vermelho). Durante a etapa de enraizamento, as plantas 8 V e 24 V permaneceram em meio de cultura contendo 10  $\mu$ M de ácido indolbutírico (AIB), enquanto as amostras 69, 93 e 102 foram expostas a 10  $\mu$ M de ácido naftalenoacético (ANA). Somente as plantas expostas ao ANA enraizaram.

Esse resultado pode sugerir uma linhagem particularmente responsiva à auxina durante o processo de enraizamento. Da mesma maneira, cultivares específicos de linho apresentam melhores índices durante a organogênese, com melhor desenvolvimento caulinar (CHAKRAVARTY e SRIVASTAVA, 1997). Segundo Gahan e George (2008), o genótipo da planta tem efeito marcante no comportamento durante a cultura de tecidos, de modo que é possível obter plantas com melhor performance em todos os aspectos da cultura. No caso de sementes de berinjela, por exemplo, sete genótipos testados apresentaram variação de respostas dentre as características observadas *in vitro*, com maior produtividade de alguns genótipos específicos (CHAKRAVARTHI *et al.* 2010). Esta relação entre genótipos e a responsividade *in vitro* é bem documentada para vários cultivares comerciais (XOCONOSTLE-CÁZARES, 2011). No caso do guanandi, no entanto, não existem genótipos sequenciados ou bem definidos, limitando a identificação de linhagens potencialmente valiosas para a micropropagação.

Além disso, pode-se sugerir a presença de um marcador RAPD que determine a característica de enraizamento *in vitro*, ou uma maior sensibilidade às auxinas adicionadas ao meio de cultura. Essa abordagem já foi sugerida para identificação de marcadores RFLP para responsividade *in vitro* de batata (COLEMAN, WAUGH e POWELL, 1990).

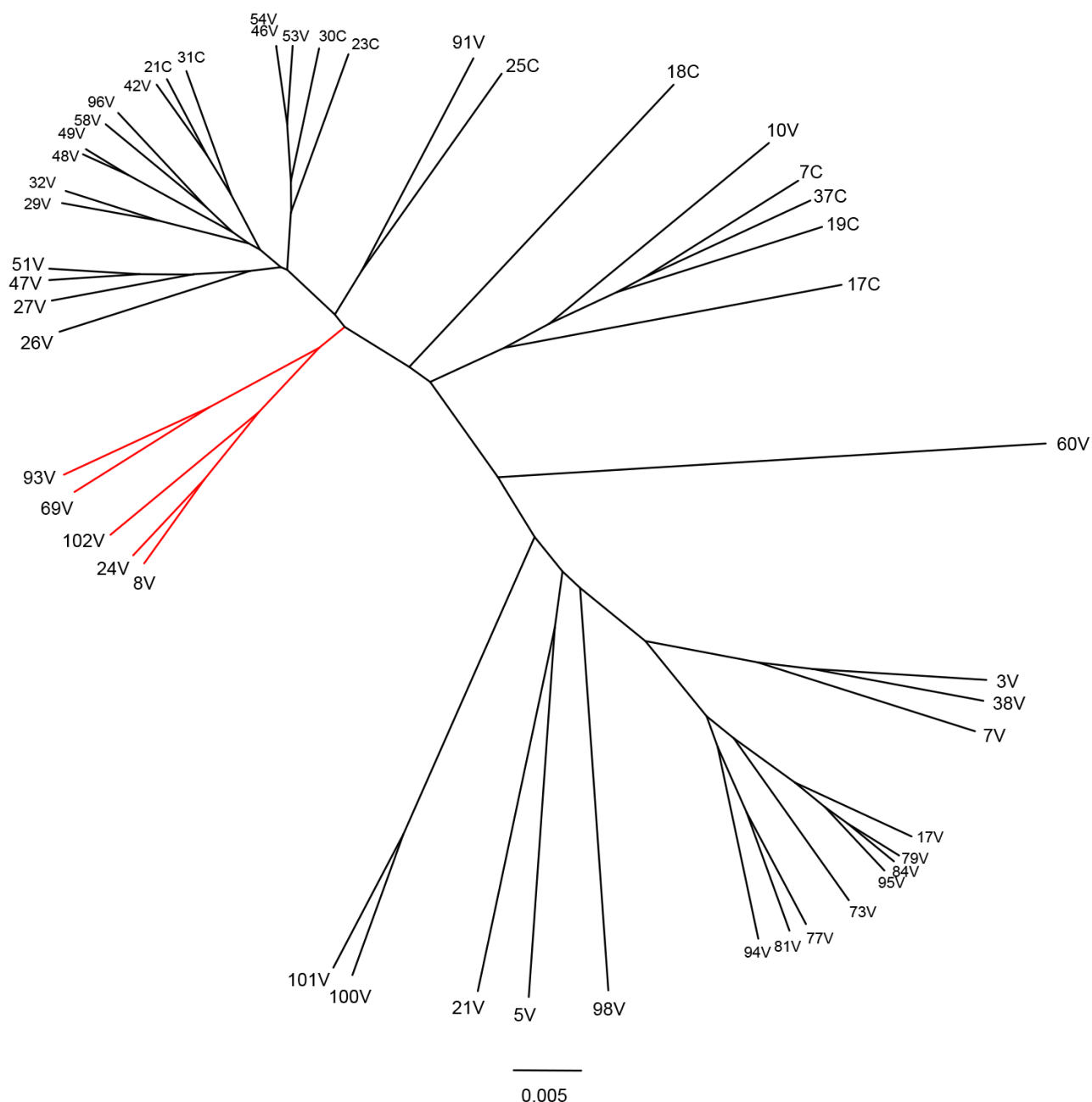


FIGURA 2 – DENDOGRAMA NÃO-ENRAIZADO REPRESENTANDO RELAÇÕES GENÉTICAS, A PARTIR DE ANÁLISE DE DISTÂNCIA (UPGMA). O COMPRIMENTO DOS RAMOS INDICA A DISTÂNCIA GENÉTICA (NEI e LI, 1979) ENTRE OS INDIVÍDUOS. V - PLANTAS MANTIDAS *IN VITRO*; C - PLANTAS DE CASA DE VEGETAÇÃO.

No caso dos indivíduos não enraizados que foram agrupados (8 V e 24 V), pode haver uma interação entre o genótipo e as condições de cultura, uma vez que foram expostos a uma auxina diferente. Conforme Chakravarthi *et al.* (2010), vários fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam as respostas *in vitro*, especialmente a

natureza e idade do explante, seu genótipo e tipo e concentração de fitorreguladores.

Diferentes variedades e genótipos de plantas podem diferir em suas necessidades de reguladores, particularmente auxinas, no meio de cultura (GEORGE, 2008). Ou seja, a base genética da competência à cultura de tecidos depende dos genes envolvidos no metabolismo hormonal das plantas (CHAKRAVARHI *et al.*, 2010). Isso indica que um melhor desempenho nas culturas *in vitro* é um reflexo da capacidade da planta em responder aos estímulos hormonais recebidos em cada etapa do cultivo.

### 3.3 ANÁLISE NJ

Da mesma forma que a análise UPGMA, o método Neighbor-joining agrupou as plantas enraizadas 69 V e 93 V, o que sugere novamente uma relação entre estes dois indivíduos (FIGURA 3, ramos em vermelho). O grupo mais aparentado contém as amostras 18 C, 21 C e 42 V, sendo as duas primeiras matrizes de casa de vegetação. O indivíduo 42 V também apresentou enraizamento na etapa *in vitro*. Essa proximidade com as plantas de casa de vegetação pode indicar um grupo de matrizes particularmente responsivo ao enraizamento *in vitro*, uma vez que sejam geneticamente aparentadas.

Outra possibilidade é a presença de um marcador genético em comum, ou seja, um padrão de bandas que possa ser utilizado como indicador da habilidade de resposta ao enraizamento *in vitro*. Os cinco indivíduos apresentam quase 55% de semelhança dentre as bandas observadas, o que torna necessárias novas análises, com novos indivíduos, enraizados ou não, para determinar se tal marcador existe. Se este marcador de fato for encontrado, pode-se seguir com o isolamento de banda em gel de agarose, purificação da amostra de DNA, clonagem da mesma através de PCR e, finalmente, seu sequenciamento para que se obtenha um primer específico que determine a predisposição às respostas durante a micropropagação.



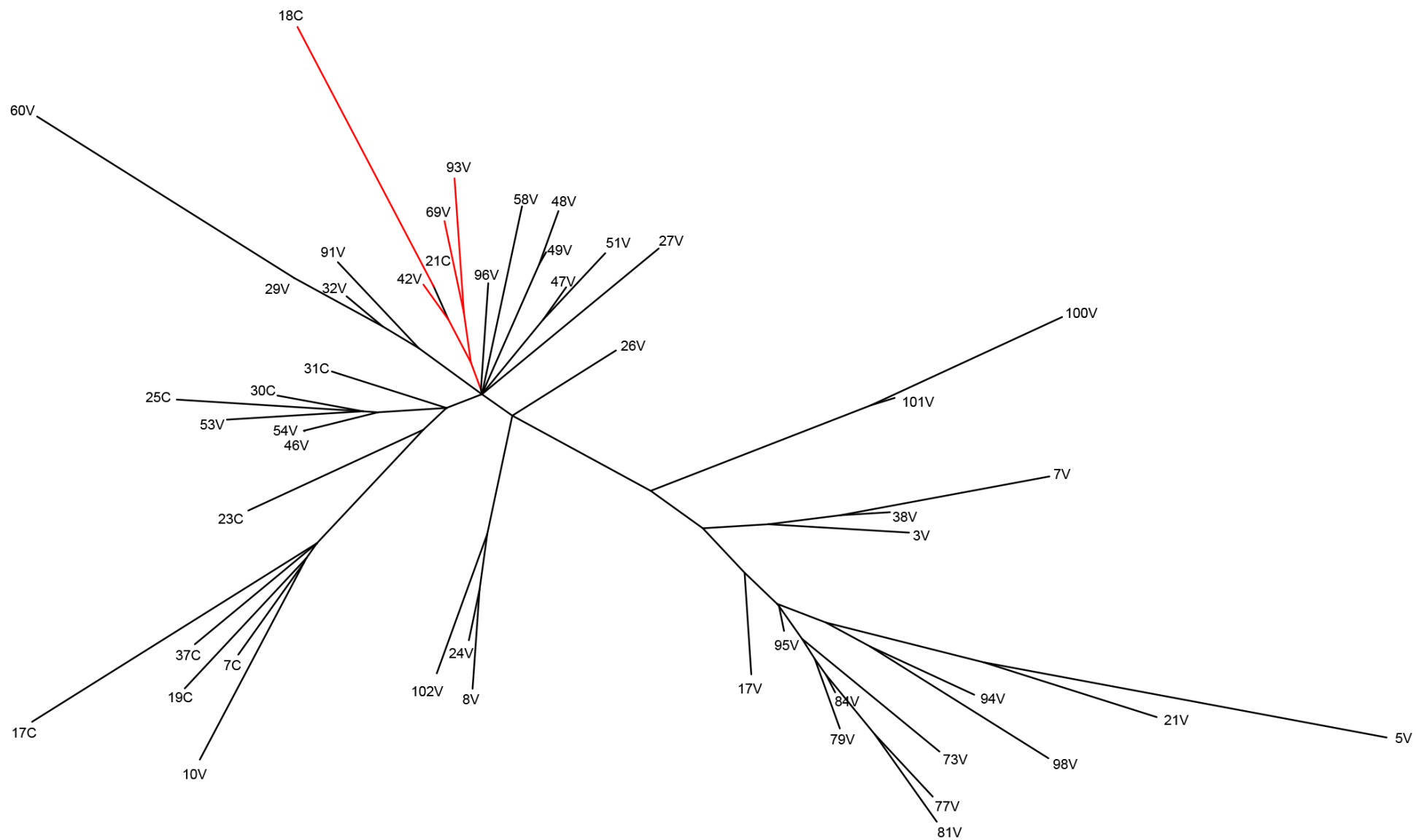


FIGURA 3 – DENDOGRAMA NÃO-ENRAIZADO REPRESENTANDO RELAÇÕES GENÉTICAS, A PARTIR DE ANÁLISE DE DISTÂNCIA (NJ). O COMPRIMENTO DOS RAMOS INDICA A DISTÂNCIA ENTRE OS INDIVÍDUOS. V - PLANTAS MANTIDAS IN VITRO; C - PLANTAS DE CASA DE VEGETAÇÃO.

## 4 CONCLUSÕES

É possível avaliar o germoplasma de guanandi proveniente de cultivo *in vitro* e casa de vegetação, via RAPD. Apesar do pequeno tempo disponível para análise molecular, considerando-se uma dissertação de mestrado, algumas conclusões podem ser listadas como importantes contribuições para a micropropagação da espécie visando sua propagação clonal.

Técnicas de refinamento e purificação do material genômico de guanandi são importantes para obtenção de DNA de qualidade para genotipagem e processamento das análises moleculares. O protocolo de extração de DNA de Ferreira e Grattapaglia (1995) foi otimizado para a espécie. A oxidação e consequente degradação de DNA pode ser minimizada, e a adição de PVP durante a maceração das folhas é eficiente para essa espécie.

Apesar do pequeno número de marcadores envolvidos, algumas associações sugeridas indicam que a técnica de RAPD seja capaz de resgatar informações sobre as características do material durante a cultura *in vitro*, bem como linhagens específicas de matrizes que apresentam maior responsividade e são preferíveis para obtenção de mudas. Alguns dos oligonucleotídeos utilizados indicam a possibilidade de desenvolvimento de marcadores específicos para características de interesse da cultura de tecidos. Se validados, estes loci indicativos de responsividade podem ser utilizados no futuro como marcadores de indivíduos superiores que apresentem as características necessárias para a micropropagação.

Apesar de algumas limitações durante o estudo, análises moleculares utilizando marcadores RAPD são relativamente simples e baratas quando comparadas a outras técnicas moleculares, além de dispensar conhecimento prévio sobre o genoma a ser estudado. A técnica foi empregada para obtenção de resultados preliminares, e pode traçar diretrizes de análises mais precisas e dispendiosas. A inclusão de maior número de primers e análises mais específicas podem ser realizadas futuramente para refinar os resultados obtidos no presente trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ARUSELVI, I.; KRISHNAVENI, S. Effects of hormones, explants and genotypes in *in vitro* culturing of sorghum. **Journal of Biochemical Technology**, v.1, n.4, p.96-103, 2009.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2 ed. Sinauer, Sunderland, MA - USA, 2004.
- BARAKAT, M. N.; EL-SAMMAK, H. In vitro mutagenesis, plant regeneration and characterization of mutants via RAPD analysis in Baby's breath *Gypsophila paniculata* L. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.2, p.214-222, 2011.
- BARDAKCI, F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Turkish Journal of Biology**, v.25, p.185-196, 2001.
- BRAR, M. S.; AL-KHAYRI, J. M.; MORELOCK, T. E.; ANDERSON, E. J. Genotypic response of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) to *in vitro* regeneration from cotyledon explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.35, n.8, p.8-12, 1999.
- CHAKRAVARTHI, B.; SRIVASTAVA, S. Effects of genotype and explant during *in vitro* response to cadmium stress and variation in protein and proline contents in linseed. **Annals of Botany**, v.79, p.487-491, 1997.
- CHAKRAVARTHI, D. V. N.; INDUKURI, V.; GOPARAJU, U. A.; YECHURI, V. Effect of genotype, explant and hormonal concentration on *in vitro* response of eggplant. **Notulae Scientia Biologicae**, v.2, n.3, p.77-85, 2010.
- COLEMAN, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Genetic analysis of *in vitro* and tissue culture response in potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.23, p.181-186, 1990.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA CERNAGEN, 1995.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.
- GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 355-402.
- GEORGE, E. F. Plant tissue procedure - Background *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. P.1-28.
- GOEL, M.K.; KUKREJA, A. K.; BISHT, N. S. In vitro manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using

adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.96, p.1-9, 2009.

HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v.79, p.45-58, 1994.

KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics Journal**, v.2, n.4, p.141-162, 2009,

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v.3, p. 91-99, 1994.

MALIYAKAL, E. J. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.9, p.2381, 1992.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.76, p.5269-5273, 1979.

PIRTTILÄ, M. A; HIRSIKORPI, M.; KÄMÄRÄINEN, T.; JAAKOLA, L.; HOHTOLA, A. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, n.3, p.273a-f, 2001.

RANI, V.; PARIDA, A.; RAINA, S. N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. **Plant Cell Reports**, v.14, p.459-462, 1995.

SAHU, S. K.; THANGARAJ, M.; KATHIRESAN, K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. **International Scholarly Research Network**, 2012.

SCHÜHLI, G. S.; OLIVEIRA, T. W. G.; OLIVEIRA, M. S. P.; FOWLER, J. A. P. Genetic selection of *Calophyllum brasiliense* for seed orchards. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.4, p.371-377, 2013.

SENTHIL KUMAR, N.; GURUSUBRAMANIAN, G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. **Science Vision**, v.11, n.3, p.116-124, 2011.

SOLIMAN, H. I. A. In vitro propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) and assessment of genetic stability of micropropagated plants using RAPD analysis. **World Applied Sciences Journal**, v.19, n.5, p.674-687, 2012.

SWOFFORD, D. L. PAUP\*. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods) version 4b10**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 2003.

XOCONOSTLE-CÁZARES, B.; RAMÍREZ-ORTEGA, F. A.; FLORES-ELENES, L.; RUIZ-MEDRANO, R. Drought tolerance in crop plants. **American Journal of Plant Physiology**, v.5, n.5, p.241-256, 2011.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J.; YE, Z. H.; MAO, J. X. **Popgene**. The user-friendly shareware for population genetic analysis version 1.32. Edmonton: University of Alberta, Molecular Biology and Biotechnology Centre, 1997.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O guanandi pode ser propagado, por meio de germinação *in vitro* de suas sementes e micropropagação a partir de segmentos nodais. Tais técnicas possibilitam a obtenção de grande número de plantas em condições controladas, podendo ser utilizadas para contornar os problemas de propagação natural da espécie. A etapa de desinfestação de sementes e segmentos nodais foi estabelecida com elevada sobrevivência das culturas, porém ainda são necessários mais estudos em relação às demais etapas *in vitro* (multiplicação, alongamento e enraizamento), sendo a aclimatização considerada pouco problemática para a espécie.

Análises moleculares utilizando a técnica RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) revelaram uma possível conexão entre o genótipo da planta-matriz e a capacidade de resposta às auxinas utilizadas durante o enraizamento de brotações. Adaptando-se um protocolo de extração de DNA foliar, a degradação de amostras foi minimizada e as análises RAPD puderam ser aplicadas. Novos estudos podem confirmar e expandir os resultados obtidos no presente trabalho, a partir do uso de novos primers ou técnicas moleculares mais refinadas.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980), UTILIZADO PARA GERMINAÇÃO *IN VITRO* E MICROPROPAGAÇÃO DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense*)

	COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (mg.L <sup>-1</sup> )
Macronutrientes	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	556
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	96
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
Micronutrientes	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22,3
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25
	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Vitaminas e aditivos	Tiamina HCl	1
	Ácido nicotínico	0,5
	Piridoxina HCl	0,5
	Glicina	2,0
	Mio-Inositol	100



ANEXO 2 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA EM ÁGUA E DESINFESTAÇÃO COM CLORETO DE MERCÚRIO, NA CONTAMINAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA EM SEMENTES DE *Calophyllum brasiliense* 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA WPM SEM REGULADORES

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO		
		F (%)	B (%)	SOB (%)
Tempo em água	2	0,0084 <sup>ns</sup>	0,0857 <sup>ns</sup>	0,1293 <sup>ns</sup>
Desinfestação com HgCl <sub>2</sub>	4	0,0504 <sup>ns</sup>	0,0537 <sup>ns</sup>	0,0728 <sup>ns</sup>
Embebição x Desinfestação	8	0,0251 <sup>ns</sup>	0,0824 <sup>**</sup>	0,0632 <sup>ns</sup>
Erro experimental	75	0,0295	0,0292	0,0472
Total	89			
Coeficiente de Variação		74,33%	70,6%	41,25%

F: porcentagem de contaminação fúngica; B: porcentagem de contaminação bacteriana; SOB: porcentagem de sementes que sobreviveram.

\*\* Significativo ao nível de 0,01 de probabilidade

<sup>ns</sup>. Não significativo

ANEXO 3 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE SEMENTES CONTAMINADAS POR FUNGOS E PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA, DURANTE GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Calophyllum brasiliense* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO À SOLUÇÃO DE CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl<sub>2</sub>), 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO WPM SEM REGULADORES.

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	
		F (%)	SOB (%)
Concentração HgCl <sub>2</sub>	1	0,0555 <sup>ns</sup>	0,0005 <sup>ns</sup>
Tempo de Exposição	1	0,1088 <sup>ns</sup>	0,2450*
Concentração x Tempo	1	0,0355 <sup>ns</sup>	0,0138 <sup>ns</sup>
Fatores x Testemunha	1	0,0017 <sup>ns</sup>	0,0054 <sup>ns</sup>
Erro experimental	85	0,0286	0,0519
Total	89		
Coeficiente de Variação		73,18%	42,19%

F: porcentagem de contaminação fúngica; SOB: porcentagem de sementes que sobreviveram.

\* Significativo ao nível de 0,05 de probabilidade

<sup>ns</sup>. Não significativo

ANEXO 4 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O EFEITO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA EM ÁGUA E DESINFESTAÇÃO COM CLORETO DE MERCÚRIO, NA CONTAMINAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA EM SEMENTES DE *Calophyllum brasiliense* 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA WPM SEM REGULADORES E ACRESCIDO DE 0,5 g.L<sup>-1</sup> DE CERCOBIN®

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO		
		F (%)	B (%)	SOB (%)
Tempo em água	2	0,0871**	0,0520 <sup>ns</sup>	0,1017 <sup>ns</sup>
Desinfestação com HgCl <sub>2</sub>	4	0,0026 <sup>ns</sup>	0,2173**	0,2604**
Embebição x Desinfestação	8	0,0060 <sup>ns</sup>	0,0453 <sup>ns</sup>	0,0501 <sup>ns</sup>
Erro experimental	75	0,0127	0,0549	0,0525
Total	89			
Coeficiente de Variação		174,95%	65,11%	39,82%

F: porcentagem de contaminação fúngica; B: porcentagem de contaminação bacteriana; SOB: porcentagem de sementes que sobreviveram.

\*\* Significativo ao nível de 0,01 de probabilidade

<sup>ns</sup>. Não significativo

ANEXO 5 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE SEMENTES CONTAMINADAS POR FUNGOS E BACTÉRIAS, E PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA, DURANTE GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Calophyllum brasiliense* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO À SOLUÇÃO DE CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl<sub>2</sub>), 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO WPM SEM REGULADORES E ACRESCIDO DE 0,5 g.L<sup>-1</sup> DE CERCOBIN®.

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO		
		F (%)	B (%)	SOB (%)
Concentração HgCl <sub>2</sub>	1	0,0022 <sup>ns</sup>	0,0355 <sup>ns</sup>	0,0555 <sup>ns</sup>
Tempo de Exposição	1	0,0022 <sup>ns</sup>	0,3200*	0,3755**
Concentração x Tempo	1	0,0022 <sup>ns</sup>	0,0170 <sup>ns</sup>	0,0022 <sup>ns</sup>
Fatores x Testemunha	1	0,0040 <sup>ns</sup>	0,5137**	0,60844**
Erro experimental	85	0,0138	0,0539	0,0534
Total	89			
Coeficiente de Variação		182,48%	64,63%	40,17%

F: porcentagem de contaminação fúngica; B: porcentagem de contaminação bacteriana; SOB: porcentagem de explantes que sobreviveram.

\* Significativo ao nível de 0,05 de probabilidade

\*\* Significativo ao nível de 0,01 de probabilidade

<sup>ns</sup>. Não significativo

ANEXO 6 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE SEMENTES CONTAMINADAS POR FUNGOS E BACTÉRIAS, E PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA, DURANTE GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Calophyllum brasiliense* EM FUNÇÃO DA SOLUÇÃO DE EMBEBIÇÃO DAS SEMENTES E CONCENTRAÇÃO DE PPM™ NO MEIO DE CULTURA, 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO WPM SEM REGULADORES.

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO		
		F (%)	B (%)	SOB (%)
Tratamento	4	0,1406**	0,0140 <sup>ns</sup>	0,1555**
Concentração de PPM™ no meio de cultura	2	0,1657*	0,0137 <sup>ns</sup>	0,2697**
Embebição x Concentração	8	0,0130 <sup>ns</sup>	0,0110 <sup>ns</sup>	0,0142 <sup>ns</sup>
Erro experimental	75	0,0713	0,0068	0,0911
Total	89			
Coeficiente de Variação		75,19%	286,38%	25,48%

F: porcentagem de contaminação fúngica; B: porcentagem de contaminação bacteriana; SOB: porcentagem de explantes que sobreviveram.

\* Significativo ao nível de 0,05 de probabilidade

\*\* Significativo ao nível de 0,01 de probabilidade

<sup>ns</sup>. Não significativo

ANEXO 7 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG), IVG PARA APARECIMENTO DA PLÚMULA E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Calophyllum brasiliense* EM FUNÇÃO DE TEMPO DE EXPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SOLUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO (GA<sub>3</sub>), EM SEMENTES INTRODUZIDAS *IN VITRO* EM MEIO WPM SEM REGULADORES.

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO		
		IVG	IVG P	G (%)
Tempo	1	0,0167*	0,0279*	0,1700**
Concentração de GA <sub>3</sub>	4	0,0364**	0,0160*	0,0675*
Tempo x Concentração	4	0,0110*	0,0018 <sup>ns</sup>	0,0690**
Erro experimental	40	0,0033	0,0044	0,0178
Total	49			
Coeficiente de Variação		52,23%	28,98%	20,22%

IVG: índice de velocidade de germinação das sementes; IVG P: índice de velocidade de germinação para aparecimento da plúmula; G: porcentagem sementes germinadas após 120 dias.

\* Significativo ao nível de 0,05 de probabilidade

\*\* Significativo ao nível de 0,01 de probabilidade

<sup>ns</sup>. Não significativo

ANEXO 8 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES CONTAMINADOS POR FUNGOS E BACTÉRIAS, E PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA, EM SEGMENTOS NODAIS DE *Calophyllum brasiliense* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO À SOLUÇÃO DE CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl<sub>2</sub>), 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO WPM SEM REGULADORES.

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO		
		F (%)	B (%)	SOB (%)
Concentração HgCl <sub>2</sub>	1	0,0005 <sup>ns</sup>	0,0320 <sup>ns</sup>	0,0675 <sup>ns</sup>
Tempo de Exposição	1	0,0005 <sup>ns</sup>	0,0980 <sup>**</sup>	0,1500 <sup>**</sup>
Concentração x Tempo	1	0,0045 <sup>ns</sup>	0,0020 <sup>ns</sup>	0,0209 <sup>ns</sup>
Erro experimental	16	0,0040	0,0112	0,01623
Total	19			
Coeficiente de Variação		140,55 %	48,21 %	24,16 %

F: porcentagem de contaminação fúngica; B: porcentagem de contaminação bacteriana; SOB: porcentagem de explantes que sobreviveram.

\*\* Significativo ao nível de 0,01 de probabilidade

<sup>ns</sup>. Não significativo

ANEXO 9 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E BACTERIANA E SOBREVIVÊNCIA DE SEGMENTOS NODAIS DE *Calophyllum brasiliense* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PPM<sup>TM</sup> NO MEIO DE CULTURA WPM 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO			
		F (%)	B (%)	N (%)	SOB (%)
Concentração de PPM <sup>TM</sup> no meio	3	0,0240*	0,0471 <sup>**</sup>	0,0189 <sup>ns</sup>	0,1365 <sup>**</sup>
Erro experimental	16	0,0050	0,0030	0,02588	0,0097
Total	19				
Coeficiente de Variação		88,39%	99,59%	142,86%	11,42%

F: porcentagem de contaminação fúngica; B: porcentagem de contaminação bacteriana; N: porcentagem de explantes que sofreram necrose; SOB: porcentagem de explantes que sobreviveram.

\* Significativo ao nível de 0,05 de probabilidade

\*\* Significativo ao nível de 0,01 de probabilidade

<sup>ns</sup>. Não significativo

ANEXO 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES OXIDADOS E COM OXIDAÇÃO INTENSA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AO MEIO DE CULTURA WPM NA OXIDAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Calophyllum brasiliense* APÓS 30 DIAS DE CULTURA.

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	
		OX (%)	INT (%)
Adição de antioxidantes no meio de cultura	5	0,3621 <sup>**</sup>	0,0153 <sup>**</sup>
Erro experimental	24	0,0271	0,0220
Total	29		
Coeficiente de Variação		26,92%	70,36%

OX: porcentagem de explantes oxidados; INT: porcentagem de explantes com oxidação intensa.

\*\* Significativo ao nível de 0,01 de probabilidade

ANEXO 11 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) NO MEIO DE CULTURA WPM, EM SEGMENTOS NODAIS DE *Calophyllum brasiliense* APÓS 90 DIAS DE CULTURA EM MEIO DE MULTIPLICAÇÃO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO
		NMB
Concentração de BAP	3	12,1163**
Erro experimental	24	1,9024
Total	27	
Coeficiente de Variação		34,57%

NMB: número médio de brotações por explante.

\*\* Significativo ao nível de 0,01 de probabilidade

ANEXO 12 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE EXPLANTES ENRAIZADOS E NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES POR EXPLANTE, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES AUXINAS E CONCENTRAÇÕES EM MEIO DE CULTURA WPM, EM SEGMENTOS NODAIS DE *Calophyllum brasiliense* APÓS 60 DIAS DE CULTURA EM ETAPA DE ENRAIZAMENTO.

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	
		ENR (%)	NMR
Regulador e concentração	3	0,0293 <sup>ns</sup>	0,8114 <sup>ns</sup>
Erro experimental	16	0,0400	1,8156
Total	19		
Coeficiente de Variação		142,86%	126,82%

ENR: porcentagem de brotações enraizadas; NMR: número médio de raízes por explante.

<sup>ns</sup>. Não significativo